

Untersuchung paraloger SEC61-Gene und –Proteine in Eukaryoten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Diplom-Biologin Kerstin Finke (geb. Voss)
geboren am 15. März 1965 in Bremen**

**Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer**

**Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. J. P. Rabe**

**Gutachter: 1. Prof. Dr. Siegfried Prehn
2. Prof. Dr. Tom A. Rapoport
3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau**

Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 1999



Zusammenfassung

Der Eintritt löslicher oder membranständiger Proteine in den Sekretionsweg beginnt mit dem Transport der Proteine durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Translokationspore wird durch den heterotrimeren Sec61-Komplex gebildet. Homologe Membranproteine der alpha- und gamma-Untereinheit dieses Komplexes sind bislang in allen daraufhin untersuchten prokaryotischen und eukaryotischen Organismen gefunden worden. Es handelt sich somit um einen entwicklungsgeschichtlich hoch konservierten Mechanismus des Proteintransports durch Membranen. Zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren haben uns mittlerweile ein komplexes Bild des Translokationsgeschehens vermittelt.

Die vorliegende Arbeit beleuchtet einen völlig neuen Aspekt der Proteintranslokation: Es zeigt sich, daß Gene, die für Komponenten des Sec61-Komplexes kodieren, in sehr unterschiedlichen eukaryotischen Organismen unabhängig voneinander dupliziert wurden und sich im folgenden nebeneinander weiterentwickelten. Die Untersuchung dieser sog. paralogen Gene und ihrer Genprodukte zum einen in Säugerzellen und zum anderen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist Gegenstand der Arbeit.

In Säugerzellen finden sich zwei sehr ähnliche SEC61 α -Gene (knapp 80% Identität auf Nukleinsäureebene, etwa 94% auf Aminosäureebene), deren Expression in verschiedenen Organen und Embryonalstadien der Maus analysiert wurde. In allen bislang getesteten Geweben wurden beide Gene exprimiert. Deutliche Unterschiede zeigten sich allerdings in der Stärke der Expression: Während die Expressionshöhe des bereits bekannten SEC61 α -I-Gens relativ konstant war, variierte die des paralogen SEC61 α -II-Gens zwischen den einzelnen Organen. Der selektive Vorteil zweier paraloger SEC61 α -Gene für den Säugerorganismus liegt somit möglicherweise in der unterschiedlichen Regulierbarkeit ihrer Expression.

In *Saccharomyces cerevisiae* finden sich paraloge Proteine und dafür kodierende Gene sowohl für die alpha-Untereinheit Sec61p als auch für die beta-Untereinheit Sbh1p des heterotrimeren Sec61p-Komplexes. Der Grad der Identität liegt mit 32% zwischen Sec61p und Ssh1p (Sec sixty-one homolog 1) allerdings erheblich niedriger als in Säugerzellen. Sbh1p und Sbh2p (Sec sixty-one beta homolog 2) sind zu etwa 50% identisch. Für die gamma-Untereinheit Sss1p wurde kein paralogenes Protein gefunden. Es konnte gezeigt werden, daß die beiden, hier neu beschriebenen Proteine Ssh1p und Sbh2p zusammen mit Sss1p einen eigenständigen, heterotrimeren Komplex, den Ssh1p-Komplex, bilden, der ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert ist und eine Funktion beim Proteintransport durch diese Membran hat. Im Gegensatz zu SEC61 ist SSH1 nicht essentiell, wenn auch das Ssh1p für normale Wachstumsraten erforderlich ist. Die Deletion des SBH2-Gens zeigt keinen Phänotyp, was allerdings für die des SBH1-Gens ebenfalls gilt. Erst das Fehlen beider Proteine führt zu einem temperatur-abhängigen Wachstumsphänotyp und zu Defekten in der Translokation.

Der entscheidende Unterschied zwischen dem Sec61p- und dem Ssh1p-Komplex scheint darin zu bestehen, daß der Sec61p-Komplex modularartig einsetzbar ist: als trimerer Komplex bei der kotranslationalen Translokation und im heptameren Sec-Komplex beim posttranslationalen Proteintransport. Demgegenüber deuten die Untersuchungen des Ssh1p-Komplexes darauf hin, daß dieser nicht mit dem tetrameren Sec62p-Sec63p-Komplex zum heptameren Sec-Komplex assoziieren kann. Vielmehr läßt er sich in Assoziation mit membrangebundenen Ribosomen nachweisen, was auf eine ausschließliche Funktion des Ssh1p-Komplexes bei der kotranslationalen Translokation schließen läßt.

Schlagwörter: Endoplasmatisches Retikulum / Proteintranslokation / Sec61 / Eukaryoten

Abstract

Soluble or membrane proteins entering the secretory pathway are first translocated across the endoplasmic reticulum (ER) membrane. The proteins move through a channel formed by the heterotrimeric Sec61-complex. Homologues of the alpha- and gamma-subunit of this complex have been found in a wide variety of procaryotic and eucaryotic organisms indicating an evolutionary highly conserved mechanism for translocating proteins across membranes. Several recent investigations contributed to a complex understanding of this process.

The work presented here sheds light on a completely new aspect of protein translocation across the ER-membrane: Interestingly genes coding for components of the Sec61-complex are found to have been duplicated independently in diverse eucaryotic organisms giving rise to so called paralogous genes (= intraspecies homologues) co-evolving after duplication. These paralogous genes and their gene products in mammalian cells as well as in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been analyzed in detail.

Mammalian cells possess two very similar SEC61 α -genes (about 80% identity on nucleic acid level, about 94% on protein level). Their expression has been analyzed for several murine organs and embryonic stages. All tissues tested so far showed expression of both genes though the level of expression differed significantly: whereas expression of the already known SEC61 α -I-gene seemed to be more or less constant across different tested organs, expression levels of the paralogous SEC61 α -II-gene were not. Consequently the ability to differentially regulate the expression of the two paralogous SEC61 α -genes may be of selective advantage for the mammalian organism.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* paralogous proteins of the alpha-subunit Sec61p as well as for the beta-subunit Sbh1p of the heterotrimeric Sec61p-complex can be found. The paralogous alpha-subunits Sec61p and Ssh1p (Sec sixty-one homolog 1) are less well conserved (32% identity) than the mammalian paralogues. Sbh1p and Sbh2p (Sec sixty-one beta homolog 2) are 50% identical. No paralogous protein was found for the gamma-subunit Sss1p. Instead, it could be shown that the new proteins Ssh1p and Sbh2p together with Sss1p are found in a heterotrimeric complex, the Ssh1p-complex, which like the Sec61p-complex localizes to the ER-membrane and has a function in translocating proteins across this membrane. In contrast to Sec61p Ssh1p is not essential for cell viability but it is required for normal growth rates. Sbh1p and Sbh2p individually are also not essential, but cells lacking both proteins are impaired in their growth at elevated temperatures and show translocation defekts *in vivo* as well as *in vitro*.

The most intriguing difference between the Sec61p-and the Ssh1p-complex might be that the Sec61p-complex has a role in both co- and post-translational translocation pathways, as a separate entity and as part of the heptameris Sec-complex, respectively. However, there was no evidence for the Ssh1p-complex being part of an heptameric complex together with the tetrameric Sec62p-Sec63p-complex, but association of the trimeric Ssh1p-complex with membrane-bound ribosomes could be shown, making it likely that the Ssh1p-complex functions exclusively in the co-translational pathway of protein transport.

Keywords: endoplasmic reticulum / protein translocation / Sec61 / eucaryotes

Inhalt

UNTERSUCHUNG PARALOGER SEC61-GENE UND -PROTEINE.....	I
IN EUKARYOTEN	I
INHALT	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. PROTEINTRANSLOKATIONSSYSTEME	2
2.2. PROTEINTRANSLOKATION DURCH DIE MEMBRAN DES ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUMS	4
2.2.1. Die kotranslationale Translokation	5
2.2.2. Die posttranslationale Translokation	9
2.2.3. Ko- versus posttranslationaler Transport	10
2.3. DIE KOMPONENTEN DES TRANSLOKATIONSAPPARATES	12
2.3.1. Entwicklungsgeschichtliche Konservierung	12
2.3.2. Der trimere Sec61p-Komplex	12
2.3.3. Der heptamere Sec-Komplex	15
2.4. PARALOGES SEC61-GENE IN EUKARYOTEN - PROBLEMSTELLUNG	15
3. ERGEBNISSE	17
3.1. ZWEI SEC61 α -GENE IN SÄUGERZELLEN	17
3.1.1. Vergleich der Nukleinsäure- und Proteinsequenzen	17
3.1.2. Analyse der Expression beider SEC61 α -Gene mittels RT-PCR	21
3.2. SEC61-PARALOGES IN DER HEFE <i>S. CEREVISIAE</i>	24
3.2.1. Das Ssh1p-Protein	24
3.2.1.1. Lokalisierung des Ssh1p in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums	24
3.2.1.2. Deletion des SSH1-Gens	27
3.2.1.3. Genetische Interaktion zwischen SSH1 und SEC61	28
3.2.1.4. Einfluß der SSH1-Deletion auf die Akkumulation von Präkursoren	28
3.2.2. Paraloge beta-Untereinheiten	30
3.2.2.1. Deletion der SBH-Gene	31
3.2.2.2. Beteiligung von Sbh1p und Sbh2p an der Proteintranslokation	32
3.2.3. Der Ssh1p-Komplex	33
3.2.3.1. Herstellung peptidspezifischer Antikörper gegen Ssh1p und Sbh2p und Immunoblot-Analyse diverser Deletionsstämme	34
3.2.3.2. Der Ssh1p-Komplex in wt-Zellen	35
3.2.3.3. Austauschbarkeit der beta-Untereinheiten	39
3.2.3.4. Der Ssh1p-Komplex in der ts-Mutante sec61-2	41
3.2.3.5. Ribosomenassoziation des Ssh1p-Komplexes	43
4. DISKUSSION	45
4.1. DIE PARALOGEN SEC61 α -GENE IN SÄUGERZELLEN	46
4.2. DER SSH1P-KOMPLEX - EIN ZWEITER AKTIVER TRANSLOKATIONS-KOMPLEX IN DER ER-MEMBRAN VON <i>S. CEREVISIAE</i>	47
4.3. DIE ROLLE DER BETA-UNTEREINHEITEN IN DER TRANSLOKATION	51
5. MATERIAL UND METHODEN	54
5.1. ALLGEMEINE METHODEN	54
5.2. METHODEN FÜR DIE RT-PCR-ANALYSE DER BEIDEN SEC61 α -GENE IN SÄUGERZELLEN	54
5.2.1. Ausgangsmaterial für die Gewinnung von RNA für die RT-PCRs	54
5.2.2. Isolierung von RNA	55
5.2.3. Reverse Transkription (RT)	56
5.2.4. PCR	56

5.2.5. Primerkombinationen für RT-PCR-Experimente	56
5.2.6. 3'-race	58
5.3. METHODEN BEIM ARBEITEN MIT <i>S. CEREVISIAE</i>	59
5.3.1. Wachstumsbedingungen und verwendete Medien	59
5.3.2. Kreuzung, Sporulation und Tetradenanalyse	60
5.3.2.1. Kreuzung von Hefestämmen	60
5.3.2.2. Sporulation	60
5.3.2.3. Tetradenanalyse	60
5.3.3. Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA	61
5.3.4. Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen	61
5.4. Klonierung und Deletion der Gene SSH1, SBH1 und SBH2	62
5.4.1. Klonierung des SSH1-Gens	62
5.4.2. Deletion des SSH1-Gens	62
5.4.3. Klonierung des SBH1-Gens	62
5.4.4. Deletion des SBH1-Gens	62
5.4.5. Klonierung des SBH2-Gens	63
5.4.6. Deletion des SBH2-Gens	63
5.4.7. Einbringen der Deletionskonstrukte in Hefezellen	64
5.5. IMMUNFLUORESCENZ	64
5.5.1. Epitop-Tagging des SSH1-Gens	64
5.5.2. Zellen für die Immunfluoreszenz	65
5.5.3. Antikörper für die Immunfluoreszenz	65
5.5.4. Immunfluoreszenz von Hefezellen	66
5.6. ANALYSE DES SSH1P-KOMPLEXES	67
5.6.1. Isolierung von Membranen aus Hefezellen	67
5.6.1.1. Membranpräparationen in analytischem Maßstab	67
5.6.1.2. Isolierung von Hefemikrosomen in präparativem Maßstab	68
5.6.2. Herstellung von Digitoninextrakten aus Hefemikrosomen	69
5.6.3. Präparation von RAMP-Fraktionen	70
5.6.4. Antikörper	71
5.6.5. Immunpräzipitationen	72
5.6.6. Reinigung des Ssh1-Komplexes (nach S. Panzner)	72
5.7. AKKUMULATION VON PRÄKURSOR-PROTEINEN IN MUTANTEN ZELLEN	73
5.7.1. Klonierung des SSH1-Gens unter Kontrolle des GAL10-Promotors	73
5.7.2. Radioaktive Markierung der Zellen und Immunpräzipitation	73
6. ANHANG	74
6.1. ZELLEN UND PLASMIDE	74
6.1.1. Bakterienstämme	74
6.1.2. Vektoren	74
6.1.3. Plasmide	75
6.1.4. Hefestämme	79
6.2. VERGLEICH DER NUKLEOTIDSEQUENZEN DER BEIDEN SEC61 α -GENE IN SÄUGERZELLEN	82
7. LITERATURVERZEICHNIS	88
LEBENS LAUF	96
PUBLIKATIONS LISTE	96
ERKLÄRUNG	97
DANKSAGUNG	97

Abkürzungsverzeichnis

ADE2	Selektionsmarker für die Hefe
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen, Selektionsmarker für <i>E. coli</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BiP	„binding to immunoglobulin precursors“, Protein der Hsp70-Familie
bp	Basenpaare
CF-1, -2	= CF-SEC61 α -I bzw. CF-SEC61 α -II, bezeichnet die SEC61 α -Gene aus dem Hund (<i>Canis familiaris</i>)
DAPI	4',6-di-Amidino-2-Phenyl-Indoldihydrochlorid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , gram-negatives Enterobacterium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	1 Äquivalent (eq) an Membranen ist definiert als 1 ml einer Membransuspension mit einer Absorption von 50 bei 280 nm (OD _{280nm} = 50)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	„expressed sequence tags“, meist im Rahmen von Genom-Sequenzierungsprojekten erhaltene cDNA-Fragmente, deren Sequenzen in Datenbanken (z.B. der NCBI-GenBank) gesammelt werden
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPs	GTPase-aktivierende Proteine
GTP	Guanosin-Triphosphat
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIS3	Selektionsmarker für die Hefe
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, konstitutiv exprimiertes Gen, hier eingesetzt als Referenzgen zum Vergleich der RNA-Mengen unterschiedlicher Präparationen
HS-1, -2	= HS-SEC61 α -I bzw. HS-SEC61 α -II, bezeichnet die humanen SEC61 α -Gene
Hsp70	70 kD-Hitzeschockprotein, Proteinfamilie mit Chaperon-Funktion; Vertreter dieser Familie sind beispielsweise DnaK und Kar2p/BiP
IP	Immunpräzipitation
Kar2p	Genprodukt des Karyogamie-Gens 2 in der Hefe; luminales ER-Protein und Mitglied der Hsp70-Proteinfamilie, Hefehomologes von BiP/GRP78, Homologie zu DnaK aus <i>E. coli</i>
kb	Kilobasenpaare
LEU2	Selektionsmarker für die Hefe
MM-1, -2	= MM-SEC61 α -I bzw. MM-SEC61 α -II, bezeichnet die SEC61 α -Gene aus der Maus (<i>Mus musculus</i>)
MCS	multi cloning site
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nukleotid(e)

OD _{xy nm}	Optische Dichte bzw. Absorption einer Lösung bei Wellenlänge xy nm.
OD _{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm; hier teilweise als Mengenangabe verwendet: 1 OD _{600nm} Hefen entsprach bei dem verwendeten Photometer 1 x 10 ⁷ haploiden Hefezellen
ORF	„open reading frame“, offenes Leseraster, kodierender Bereich eines Gens
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI	Proteaseinhibitor, verwendet wurde ein Gemisch aus Leupeptin, PepstatinA und Chymostatin
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid, Inhibitor von Serinproteasen
ppαF	Präpro-alpha-Faktor, Sexualhormon aus <i>S. cerevisiae</i> , bestehend aus der prä-Sequenz (Signalsequenz), einem pro-Teil und vier identischen Kassetten, die den reifen alpha-Faktor enthalten.
ProOmpA	Vorläufer des Bakterienproteins A der äußeren Membran (precursor of outer membrane protein A), kein Membranprotein !
Q-Sepharose	Anionenaustauscher, modifiziert mit quartären Aminoethylgruppen
race	rapid amplification of cDNA ends, PCR-Methode zur Amplifizierung von 3'- oder 5'-Bereichen eines Gens
RN-1, -2	= RN-SEC61α-I bzw. RN-SEC61α-II, bezeichnet die SEC61α-Gene aus der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)
RT	Reverse Transkription
S	Svedberg-Einheit; Maß der Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels im Gravitationsfeld
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , eine einzellig wachsende Hefe
SDS	Natriumdodecylsulfat; ein Detergens, das stark an Proteine bindet und sie dabei denaturiert; Verwendung bei der Elektrophorese von Proteinen
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molmasse
Sec	Sec-Proteine bzw. Sec-Mutanten wurden in genetischen Screens auf Mutanten mit Defekten in der Sekretion gefunden
SP-Sepharose	Kationenaustauscher mit einer Sulfopropylgruppe
SR	SRP-Rezeptor, auch „docking protein“ genannt
SRP	Signalsequenz-Erkennungspartikel (signal recognition particle), Ribonucleoproteinkomplex
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenzgen, Selektionsmarker für <i>E. coli</i>
TRAM	„translocating chain associated membrane protein“, translokations-assoziiertes Membranprotein
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethanol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP1	Selektionsmarker für die Hefe
ts-	temperatur-sensitiv; ts-Mutanten zeigen erst oberhalb einer für die jeweilige Mutation charakteristischen Temperatur einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp
URA3	Selektionsmarker für die Hefe
wt	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Der Eintritt löslicher oder membranständiger Proteine in den Sekretionsweg beginnt mit dem Transport der Proteine durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Translokationspore wird durch den heterotrimeren Sec61-Komplex gebildet. Homologe Membranproteine der alpha- und gamma-Untereinheit dieses Komplexes sind bislang in allen daraufhin untersuchten prokaryotischen und eukaryotischen Organismen gefunden worden. Es handelt sich somit um einen entwicklungsgeschichtlich hoch konservierten Mechanismus des Proteintransports durch Membranen. Zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren haben uns mittlerweile ein komplexes Bild des Translokationsgeschehens vermittelt.

Die vorliegende Arbeit beleuchtet einen völlig neuen Aspekt der Proteintranslokation: Es zeigt sich, daß Gene, die für Komponenten des Sec61-Komplexes kodieren, in sehr unterschiedlichen eukaryotischen Organismen unabhängig voneinander dupliziert wurden und sich im folgenden nebeneinander weiterentwickelten. Die Untersuchung dieser sog. paralogen Gene und ihrer Genprodukte zum einen in Säugerzellen und zum anderen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist Gegenstand der Arbeit.

In Säugerzellen finden sich zwei sehr ähnliche SEC61 α -Gene (knapp 80% Identität auf Nukleinsäureebene, etwa 94% auf Aminosäureebene), deren Expression in verschiedenen Organen und Embryonalstadien der Maus analysiert wurde. In allen bislang getesteten Geweben wurden beide Gene exprimiert. Deutliche Unterschiede zeigten sich allerdings in der Stärke der Expression: Während die Expressionshöhe des bereits bekannten SEC61 α -I-Gens relativ konstant war, variierte die des paralogen SEC61 α -II-Gens zwischen den einzelnen Organen. Der selektive Vorteil zweier paraloger SEC61 α -Gene für den Säugerorganismus liegt somit möglicherweise in der unterschiedlichen Regulierbarkeit ihrer Expression.

In *Saccharomyces cerevisiae* finden sich paraloge Proteine und dafür kodierende Gene sowohl für die alpha-Untereinheit Sec61p als auch für die beta-Untereinheit Sbh1p des heterotrimeren Sec61p-Komplexes. Der Grad der Identität liegt mit 32% zwischen Sec61p und Ssh1p (Sec sixty-one homolog 1) allerdings erheblich niedriger als in Säugerzellen. Sbh1p und Sbh2p (Sec sixty-one beta homolog 2) sind zu etwa 50% identisch. Für die gamma-Untereinheit Sss1p wurde kein paraloges Protein gefunden. Es konnte gezeigt werden, daß die beiden, hier neu beschriebenen Proteine Ssh1p und Sbh2p zusammen mit Sss1p einen eigenständigen, heterotrimeren Komplex, den Ssh1p-Komplex, bilden, der ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert ist und eine Funktion beim Proteintransport durch diese Membran hat. Im Gegensatz zu SEC61 ist SSH1 nicht essentiell, wenn auch das Ssh1p für normale Wachstumsraten erforderlich ist. Die Deletion des SBH2-Gens zeigt keinen Phänotyp, was allerdings für die des SBH1-Gens ebenfalls gilt. Erst das Fehlen beider Proteine führt zu einem temperatur-abhängigen Wachstumsphänotyp und zu Defekten in der Translokation.

Der entscheidende Unterschied zwischen dem Sec61p- und dem Ssh1p-Komplex scheint darin zu bestehen, daß der Sec61p-Komplex modular einsetzbar ist: als trimerer Komplex bei der kotranslationalen Translokation und im heptameren Sec-Komplex beim posttranslationalen Proteintransport. Demgegenüber deuten die Untersuchungen des Ssh1p-Komplexes darauf hin, daß dieser nicht mit dem tetrameren Sec62p-Sec63p-Komplex zum heptameren Sec-Komplex assoziieren kann. Vielmehr läßt er sich in Assoziation mit membrangebundenen Ribosomen nachweisen, was auf eine ausschließliche Funktion des Ssh1p-Komplexes bei der kotranslationalen Translokation schließen läßt.

2. Einleitung

2.1. Proteintranslokationssysteme

Der Transport von Proteinen ist für einzellige wie vielzellige Organismen von essentieller Bedeutung. Dies gilt für den Import oder Export von Proteinen ebenso wie für den Transport an unterschiedliche Bestimmungsorte innerhalb der Zelle. Dabei müssen oftmals Membranen überquert werden, die zum einen als Abgrenzung der Zelle gegenüber ihrer Umgebung fungieren, zum anderen durch Kompartimentierung auch der räumlichen wie funktionellen Strukturierung des Zellinneren dienen. Die Lipidschichten der Membranen sind nur für kleine unpolare oder ungeladene polare Moleküle permeabel. Alle geladenen oder größeren Moleküle benötigen Transportmoleküle oder Kanäle für die Durchquerung dieser Membranen. Auf diese Weise wird ein kontrollierter Transport ermöglicht.

An Transportsysteme für Proteine werden hohe Anforderungen gestellt, da es sich dabei um den Transport teilweise sehr großer Moleküle handelt. Um eine einwandfreie Funktion der Proteine in ihrer korrekten subzellulären Lokalisation zu gewährleisten, muß Proteintransport zielgerichtet, effizient und mit großer Zuverlässigkeit erfolgen. Fast ein Drittel aller Zellproteine sind Membranproteine, und auch viele lösliche Proteine durchqueren eine oder mehrere Membranen, um ihren finalen Bestimmungsort innerhalb oder außerhalb der Zelle zu erreichen. Somit müssen fast die Hälfte aller in einer durchschnittlichen Zelle synthetisierten Proteine in Membranen integriert oder durch Membranen transloziert werden. Es ist daher nicht verwunderlich, daß sich in den Zellen ausgefeilte Translokationssysteme für den Proteintransport durch diverse Membranen etabliert haben.

Einen vergleichenden Überblick über die verschiedenen Translokationssysteme gibt der Artikel von Schatz und Dobberstein (1996). Die Autoren unterscheiden zwei Hauptgruppen von Proteintransportsystemen: Exportsysteme und Importsysteme (Tab. 1). Als Exportsysteme werden solche Translokatoren verstanden, die Proteine aus dem Zytosol in extrazytosolische Kompartimente wie beispielsweise das Periplasma von Bakterien, das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), das Thylakoidlumen von Chloroplasten oder die innere Mitochondrienmembran transportieren. Demgegenüber transportieren Importsysteme Proteine in Kompartimente, die funktional dem Zytosol äquivalent sind oder sich entwicklungsgeschichtlich von Zytosol ableiten (Endosymbiontentheorie). Dies ist der Fall für die gekoppelten Translokationskanäle der äußeren und inneren Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten sowie für die Peroxisomenmembranen. Mitochondrien und Chloroplasten besitzen damit sowohl Export- als auch Importsysteme für den Proteintransport.

EXPORTSYSTEME	IMPORTSYSTEME
Innere Membran von Bakterien (Zytosol → Zytoplasmamembran/Periplasma)	Äußere und Innere Membran von Mitochondrien (Zytosol → Matrix/Innere Membran/Äußere Membran/Intermembranraum)
Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Zytosol → ER-Membran/ER-Lumen)	Äußere und Innere Membran von Chloroplasten (Zytosol → Stroma/Innere Membran/Äußere Membran/Intermembranraum)
Innere Membran von Mitochondrien (Matrix → Innere Membran)	Peroxisomale Membran (Zytosol → Matrix)
Innere Membran von Chloroplasten/Thylakoidmembran (Stroma → Innere Membran/Intermembranraum/ Thylakoidmembran/Thylakoidlumen)	

Tab. 1. Transportsysteme zur Proteintranslokation. Aufgeführt sind die Membranen durch die der Proteintransport stattfindet, sowie in Klammern Ausgangs- und mögliche Zielorte der transportierten Proteine (Einteilung nach Schatz und Dobberstein, 1996).

Gemeinsam sind allen diesen Transportsystemen folgende Charakteristika:

1. Die transportierten Proteine tragen in aller Regel eine **aminoterminalen Signalsequenz**, die oftmals noch während des Transportes abgespalten wird.
2. Auf der cis-Seite der Membran befindet sich ein „**Targeting**“-System, das die zu transportierenden Proteine zum Translokationskanal geleitet. Dieses besteht zumeist aus zytosolischen Faktoren und in der Membran lokalisierten Rezeptoren.
3. Der Transport erfolgt durch einen **heterooligomeren Transportkanal**, der sich sowohl zum Zielkompartiment hin als auch lateral in die Membran öffnen kann.
4. Ein peripher mit dem Translokationskanal verbundener **Protein-Translokationsmotor** liefert die Energie für den Transport des Proteins durch Hydrolyse von Nukleosid-Triphosphaten.
5. In den meisten Fällen bleibt das zu transportierende Protein während der Translokation zumindest **teilweise ungefaltet**.
6. Auf der trans-Seite des Translokationskanals befindet sich ein **System zur Faltung der transportierten Proteine**.

Diese allgemeinen Charakteristika treffen auf die meisten Translokationssysteme und Transportsubstrate zu, es finden sich jedoch auch Ausnahmen: So wurde beispielsweise eine Gruppe von integralen Membranproteinen beschrieben, die keine Signalsequenz, sondern ein carboxyterminal gelegenes hydrophobes Segment besitzen und deren Transportmechanismus sich von denen mit aminoterminaler Signalsequenz unterscheidet (Kutay et al., 1993, 1995). Weitere Beispiele finden sich für den peroxisomalen Transport, der in mehreren Aspekten von dem der übrigen Translokationssysteme abweicht. So können beispielsweise peroxisomale „Targeting“-Sequenzen (PTS) aminoterminal oder carboxyterminal gelegen sein. Darüber hinaus konnte der Import stabil gefalteter, teilweise sogar oligomerisierter Proteine in Peroxisomen gezeigt werden (Walton et al., 1995; Glover et al., 1994).

Zahlreiche Komponenten der oben genannten Translokationssysteme sind in den letzten Jahrzehnten identifiziert und zum Teil auch isoliert und charakterisiert worden. Dabei zeigten besonders die untersuchten Exportsysteme eine im Zuge der Evolution starke Konserviertheit der einzelnen Proteinkomponenten. Dies trifft insbesondere für den Vergleich der Translokationssysteme durch die bakterielle Zytoplasmamembran und die Membran des ER in Eukaryoten zu. Aber auch das Translokationssystem in der Thylakoidmembran der Chloroplasten ähnelt stark dem bakteriellen System. Die starke Konservierung der zentralen Komponenten der Translokationssysteme beschränken sich jedoch nicht nur auf Prokaryoten und Eukaryoten, sondern erstrecken sich auch auf Archaeobakterien, wie Pohlschröder et al. (1997) in einem aktuellen Übersichtsartikel zeigten.

Da sich die vorliegende Arbeit mit Aspekten der Proteintranslokation durch die ER-Membran in Eukaryoten beschäftigt, soll das hierfür erforderliche Transportsystem im folgenden näher beschrieben werden. Dabei werden auch Vergleiche zum bakteriellen Translokationssystem gezogen.

2.2. Proteintranslokation durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums

Die Synthese eines jeden Proteins beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. Proteine, die nicht dort verbleiben sollen, tragen in der Regel an ihrem Aminoterminus sogenannte Signal- oder Leitsequenzen, die sie für den Transport in die unterschiedlichen Kompartimente, wie beispielsweise den Kern, die Plastiden oder die verschiedenen Komponenten des sekretorischen Weges, kennzeichnen. Letztgenannter führt über das ER und den Golgi-Apparat per Vesikeltransport zu Lysosomen, Endosomen, der Zytoplasmamembran oder zum Transport aus der Zelle heraus. Die meisten Proteine, lösliche wie auch Membranproteine, deren finaler Bestimmungsort entlang dieses sekretorischen Weges liegt oder die für den Export aus der Zelle vorgesehen sind, müssen somit zunächst durch die ER-Membran transportiert oder in sie integriert werden.

Die **Signalsequenz**, die Proteine für den Transport durch die ER-Membran determiniert, ist bei den meisten Proteinen aminoterminal (N-terminal) lokalisiert. Die N-terminalen Signalsequenzen weisen keine strikte Konsensussequenz, sondern eine charakteristische dreigeteilte Struktur auf: Einem positiv geladenen Aminoterminus folgt ein Abschnitt aus mindestens sechs hydrophoben Aminosäureresten und einer eher polaren carboxyterminalen (C-terminalen) Region ohne geladene Aminosäurereste, an deren Ende sich oftmals eine Schnitterkennungsstelle für die Signalpeptidase befindet (von Heijne, 1985). In diesem Fall wird die Signalsequenz auf der luminalen Seite der ER-Membran von dem translozierten Protein abgetrennt. Dies kann noch während des Translokationsvorgangs durch den in der ER-Membran lokalisierten Enzymkomplex der Signalpeptidase geschehen.

Für viele integrale Membranproteine ist die Signalsequenz mit dem ersten Membrananker identisch. Der hydrophobe Abschnitt dieser sogenannten **Signalankersequenzen** muß lang genug sein, um die Membran zu durchspannen. Die hydrophoben Regionen der meisten Signalanker weisen eine Länge von 20 - 30 Aminosäureresten auf (Nilsson et al., 1994). Diese Transmembransegmente fungieren als „Stop-Transfer“-Sequenzen, d.h. sie werden vom

Translokationsapparat erkannt, stoppen die Translokation und bewirken, daß sich die Translokationspore lateral öffnet und das Segment in die Membran entläßt. Es finden sich aber auch integrale Membranproteine, bei denen diese beiden Funktionen getrennt sind und auf eine aminoterminal Signalsequenz eine weiter carboxyterminal gelegene hydrophobe „Stop-Transfer“-Sequenz aus 20 - 30 Aminosäuren folgt. In diesem Fall wird die Translokation durch die Signalsequenz initiiert und die „Stop-Transfer“-Sequenz wird zum ersten Transmembransegment.

Proteine mit aminoterminaler Signalsequenz können auf zweierlei Weise durch die ER-Membran transloziert werden: **kotranslational oder posttranslational**. Im ersten Fall wird noch während der Translation des Proteins durch das Ribosom die wachsende Polypeptidkette durch die Membran transloziert; im zweiten Fall wird das Protein zunächst im Zytosol vollständig synthetisiert und erst anschließend transloziert. Durch den Einsatz sehr unterschiedlicher methodischer Ansätze konnten in den vergangenen Jahren viele Komponenten, die an der Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum beteiligt sind, identifiziert, etliche davon gereinigt und hinsichtlich ihrer Funktion getestet werden.

Dazu beigetragen haben:

- **genetische Screens** in Hefe auf Defektmutanten im Proteintransport
- die Identifizierung von Membranproteinen, die sich in nächster Nähe zu translozierten Polypeptiden befinden, durch **chemische Quervernetzung**
- die **Rekonstitution** von solubilisierten und gereinigten Translokationskomponenten in Proteoliposomen

Darüber hinaus konnten elektrophysiologische Untersuchungen und Fluoreszenzabschwächungsexperimente das Vorhandensein eines großen, hydrophilen Translokationskanals von etwa 40 - 60 Å Durchmesser nachweisen (Simon und Blobel, 1991; Crowley et al., 1993, 1994; Hamman et al., 1997). Durch elektronenmikroskopische Bilder schließlich konnten Translokationskanäle als ringförmige Strukturen sichtbar gemacht werden (Hanein et al., 1996).

Wie sich herausstellte, werden einige Komponenten des Translokationsapparates, wie beispielsweise der Translokationskanal für den Transport durch bzw. die Integration in die Membran, sowohl für die ko- als auch für die posttranslationale Translokation genutzt. Andere Komponenten dagegen, wie beispielsweise die benötigten zytosolischen Faktoren, sind für die einzelnen Wege spezifisch. Im folgenden sollen beide Translokationsmodi dargestellt werden.

2.2.1. Die kotranslationale Translokation

Bei der kotranslationalen Translokation sind Translation und Translokation eines Proteins gekoppelt. In einer ersten - als „Targeting“ bezeichneten - Phase muß der Komplex aus Ribosom, mRNA und naszierender Polypeptidkette spezifisch an die ER-Membran transportiert werden (Abbildung 1). Dazu bindet ein Ribonukleoproteinkomplex, das **SRP** (= **Signal Recognition Particle**), an die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette, sobald diese den Tunnel der großen ribosomalen Untereinheit soweit verlassen hat, daß sie zugänglich ist. Die Bindung des SRP an die Signalsequenz bewirkt eine starke Verlangsamung der Proteinsynthese. So wird die vorzeitige Faltung der wachsenden

Polypeptidkette verhindert, während das SRP seine zweite Funktion ausführt, nämlich das Ribosom mit der naszierenden Kette an die ER-Membran zu dirigieren. Dort ist der **SRP-Rezeptor** (auch „**docking protein**“ genannt) lokalisiert, an den der Komplex aus Ribosom, naszierender Kette und SRP binden kann. Durch die Interaktion zwischen SRP und dem SRP-Rezeptor wird die selektive Bindung des Ribosoms mit der naszierenden Kette an den Translokationskomplex in der ER-Membran ermöglicht. Neuere Arbeiten zeigen, daß die Spezifität dieses „Targeting“-Schrittes an die ER-Membran von zytosolischen Faktoren unabhängig ist und allein auf das Vorhandensein einer funktionellen Signalsequenz und der Bindung des SRP an diese zurückzuführen ist (Neuhof et al., 1998; Raden und Gilmore, 1998). Guanosin-Triphosphat (GTP)-Hydrolyse durch SRP und SRP-Rezeptor, die sich als GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) gegenseitig zu stimulieren scheinen (Powers und Walter, 1995) führt zur Freisetzung von SRP und SRP-Rezeptor, die damit beide für eine weitere „Targeting“-Runde zur Verfügung stehen. Mit der Bindung des Ribosoms und der naszierenden Kette an die Translokationspore kann nun die zweite Phase, die eigentliche Translokation der Polypeptidkette durch die ER-Membran, beginnen.

Im Säugersystem konnte in Rekonstitutionsexperimenten gezeigt werden, daß nur drei Membrankomponenten für den kotranslationalen Transport von Proteinsubstraten *in vitro* erforderlich sind: der SRP-Rezeptor, das TRAM-Protein (s.u.) und der heterotrimere **Sec61p-Komplex** (Görllich und Rapoport, 1993). Photochemische Quervernetzungsexperimente zeigten, daß die multimembranspannende α -Untereinheit des Komplexes (Sec61 α) sich während des gesamten Transfers durch die Membran in unmittelbarer Nähe zu der naszierenden Kette befindet (High et al., 1991, 1993a; Kellaris et al., 1991; Görllich et al., 1992b; Mothes et al., 1994; Nicchitta et al., 1995). Aus diesen Experimenten ließ sich schließen, daß der trimere Sec61p-Komplex eine zentrale Rolle bei der Translokation von Proteinen durch die ER-Membran spielt und vermutlich die Hauptkomponente der Translokationspore darstellt. Neuere, elektronenmikroskopische Untersuchungen unterstützen diese Annahme durch den Nachweis ringförmiger Strukturen aus jeweils 3 bis 4 heterotrimeren Sec61p-Komplexen sowohl in rekonstituierten Proteoliposomen als auch in nativen Membranen (Hanein et al., 1996).

Der Sec61p-Komplex bildet nicht nur die Pore, sondern fungiert auch als Ribosomenrezeptor (Kalies et al., 1994). Wie kryoelektronenmikroskopische Bilder zeigen, bildet dabei der aus dem Sec61-Oligomer gebildete Kanal in der ER-Membran eine direkte Verlängerung des Kanals in der großen ribosomalen Untereinheit, durch den das naszierende Polypeptid das Ribosom verläßt (Beckmann et al., 1997). Die Bindung des Ribosoms zum Sec61p-Komplex ist zu Beginn der Translokation nur locker, denn die naszierende Polypeptidkette ist für Proteasen noch zugänglich und unter hohen Salzkonzentrationen extrahierbar. Infolge der Kettenverlängerung durch Translation bildet sich im weiteren eine festere Bindung zwischen Ribosom und Sec61p-Komplex. Nun kann die naszierende Kette weder proteolytisch angegriffen noch durch hohe Salzkonzentrationen extrahiert werden. Dieser Schritt setzt allerdings voraus, daß die naszierende Polypeptidkette eine funktionelle Signalsequenz aufweist. Somit findet hier offenbar im Inneren der Membran ein zweiter Signalsequenz-Erkennungsschritt statt, der schließlich zu einer vollständigen Insertion der naszierenden Kette in den Translokationskanal führt (Jungnickel und Rapoport, 1995).

Der hydrophobe Abschnitt der Signalsequenz befindet sich in dieser frühen Phase der Translokation in unmittelbarer Nähe sowohl zum Sec61p-Komplex als auch zu Lipiden (Martoglio et al., 1995). Untersuchungen von Mothes et al. (1998) deuten darauf hin, daß es

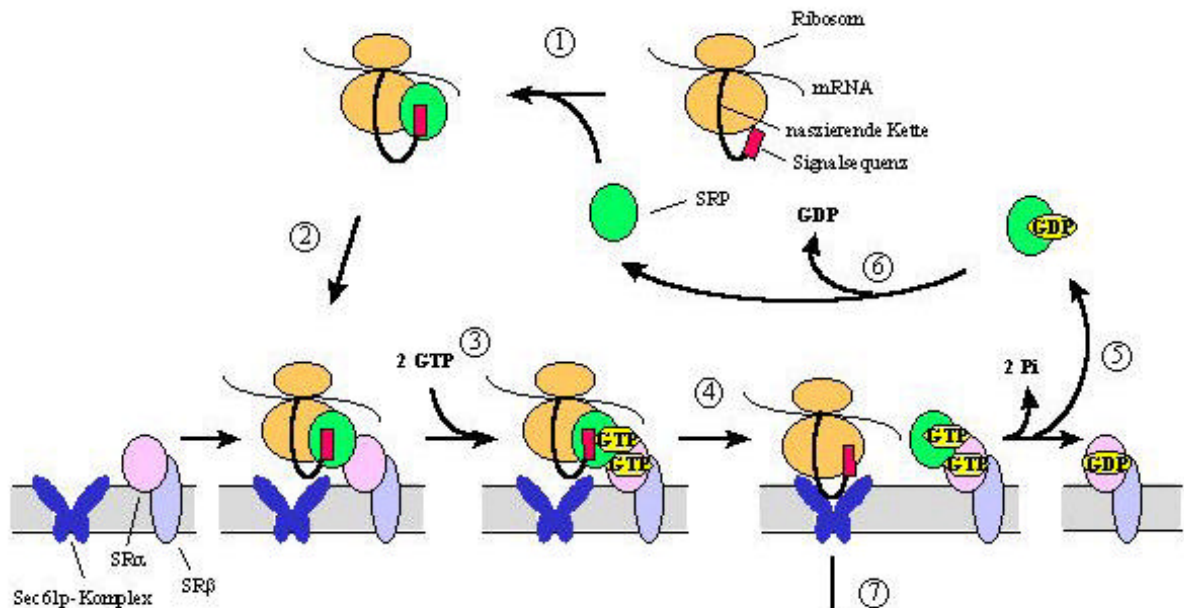
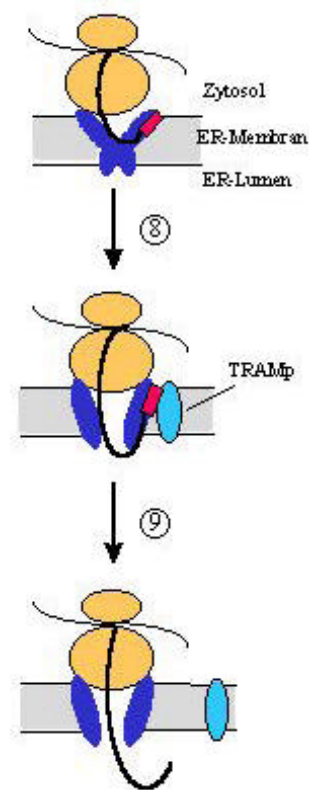


Abbildung 1. Modell der kotranslationalen Translokation.

Schematisch dargestellt sind das „Targeting“ (mit SRP-Zyklus) des Ribosoms und der naszierenden Kette an die ER-Membran sowie frühe Stadien der Translokation (nach Rapoport et al., 1996, modifiziert). **(I) „Targeting“:** Sobald die Signalsequenz der wachsenden Polypeptidkette das Ribosom verlassen hat, kann SRP sowohl an die Signalsequenz als auch an das Ribosom binden (Schritt 1). Im 2. Schritt bindet der Komplex aus Ribosom, naszierender Kette und SRP an die ER-Membran. Dies geschieht durch Wechselwirkungen sowohl zum SRP-Rezeptor (SR) als auch zum Sec61p-Komplex, der die Translokationspore bildet. Im folgenden kommt es zu einer kooperativen Bindung von GTP sowohl an SRP als auch an die alpha-Untereinheit des SRP-Rezeptors (SRα) (Schritt 3; Rapiejko und Gilmore, 1997). Daraufhin kann die Signalsequenz von SRP auf die alpha-Untereinheit des Sec61p-Komplexes (Sec61α) übertragen werden (Schritt 4). Damit ist das „Targeting“ abgeschlossen und die eigentliche Translokation der Polypeptidkette kann beginnen. Durch GTP-Hydrolyse sowohl durch SRP als auch SRα kann SRP sich vom SR lösen (Schritt 5). Aufgrund ihrer geringen Affinität zu GDP können SRP und SRα in ihren Nukleotid-freien Zustand zurückkehren (Schritt 6) und stehen damit für eine weitere „Targeting“-Runde zur Verfügung.

(II) Translokation: Schritt 7 zeigt die Insertion der naszierenden Kette in die Translokationspore. Dabei hat die Signalsequenz zum Sec61p-



Komplex und zusätzlich zur Lipidschicht Kontakt. Das Ribosom ist in dieser Phase nur locker an den Sec61p-Komplex gebunden. Im weiteren nimmt das naszierende Polypeptid im Zuge der Kettenverlängerung eine Loop-Struktur an, und die Signalsequenz wird in einem Erkennungsschritt, in den der Sec61p-Komplex und das TRAM-Protein involviert sind, ein weiteres Mal überprüft. Bei funktioneller Signalsequenz resultiert nun die endgültige Insertion der naszierenden Kette in die Translokationspore: die Signalsequenz ist in Kontakt mit dem TRAM-Protein, das Ribosom ist fest an den Sec61p-Komplex gebunden, und die Translokationspore öffnet sich zum Lumen hin (Schritt 8). Schritt 9 zeigt die Phase der Translokation, in der die Signalsequenz bereits abgeschnitten ist, TRAMP befindet sich nicht länger in unmittelbarer Nähe zu der naszierenden Kette, die mittlerweile eine transmembrane Orientierung angenommen hat. Die wachsende Polypeptidkette wird durch einen kontinuierlichen, nach außen fest versiegelten Kanal aus Ribosom und Sec61p-Komplex durch die Membran transferiert (für weitere Einzelheiten und Referenzen, siehe Text).

eine spezifische Bindungsstelle für Signalsequenzen an der Grenzfläche zwischen dem Kanal und den umgebenden Lipiden gibt. In Säugerzellen konnte zudem für den geladenen aminoterminalen Bereich der Signalsequenz der Kontakt zu einem weiteren Membranprotein, **TRAMP** (**T**ranslocating chain-associating **m**embrane **p**rotein), nachgewiesen werden (Görlich et al., 1992a; High et al., 1993b; Mothes et al., 1994). Die Funktion des TRAMP-Proteins ist bislang nicht eindeutig geklärt. Voigt et al. (1996) zeigten, daß TRAMP für die Translokation der meisten sekretorischen Proteine notwendig ist und daß diese Notwendigkeit durch die Signalsequenz determiniert wird. Zudem könnte TRAMP eine Rolle bei der kotranslationalen Integration von Membranproteinen spielen (Do et al., 1996; Knight und High, 1998).

In dieser frühen Phase der Translokation ist die Translokationspore sowohl zum ER-Lumen als auch durch das Ribosom zum Zytosol hin dicht verschlossen (Crowley et al., 1993). Dabei spielt möglicherweise das luminal Hsp70-Protein **BiP** („binding to immunoglobulin precursors“) eine wichtige Rolle (Hamman et al., 1998). Die Öffnung der Pore zum ER-Lumen hin findet erst statt, wenn die naszierende Kette eine kritische Länge von mindestens 70 Aminosäureresten erreicht hat (Crowley et al., 1994). Dies entspricht interessanterweise der gleichen Kettenlänge, die für den zweiten Signalsequenz-Erkennungsschritt erforderlich ist (Jungnickel und Rapoport, 1995). Möglicherweise wird der Verschußmechanismus der Translokationspore also durch die Signalsequenz reguliert.

Im einfachsten Fall des Transportes sekretorischer Proteine kann nach Öffnung der Translokationspore nun die eigentliche Translokation des Proteins erfolgen. Indem das Ribosom den Tunnel des Translokons zum Zytoplasma hin versiegelt, bleibt dem weiter synthetisierten Protein nur eine Richtung, die in das ER-Lumen. Ob das Ribosom die naszierende Kette dabei aktiv durch die Membran schiebt, wie es durch die GTP-betriebene Polypeptid-Elongationsmaschinerie des Ribosoms denkbar wäre, ist bislang unklar. Diskutiert wird auch eine Zugwirkung von Chaperonen der Hsp70-Proteinfamilie im ER-Lumen. Brodsky et al. (1995) beobachteten die Notwendigkeit von Hsp70 (BiP) beim kotranslationalen Transport von Invertase in Hefe-Mikrosomen. Dagegen war im rekonstituierten Säugersystem aus gereinigten Membranproteinen für den kotranslationalen Transport keine Beteiligung von Hsp70 (BiP) erforderlich (Görlich und Rapoport, 1993).

Vergleicht man diese Prozesse der Translokation von Proteinen mit denen der Integration von Membranproteinen in die ER-Membran, so erfordert letztere noch ein weit komplexeres Zusammenspiel der Komponenten der Translokationsmaschinerie. Einige Abschnitte werden in das Lumen transloziert, andere verbleiben im Zytoplasma, und die hydrophoben Segmente, die das Protein letztendlich in der Membran verankern sollen, müssen in der richtigen Orientierung in die Lipidschicht integriert werden. Neuere Arbeiten zeigen, daß dies durch ein strikt reguliertes Aufeinanderfolgen von Bindung, Ablösung und erneuter Bindung des Komplexes aus Ribosom und naszierender Kette an die Translokationspore ermöglicht wird (Mothes et al., 1997; Liao et al., 1997). Dabei ist die Pore zu jedem gegebenen Zeitpunkt in höchstens eine Richtung geöffnet, so daß die Permeabilitätsbarriere gewahrt bleibt (Liao et al., 1997).

Im ER-Lumen erfolgt noch während der Translation und Translokation des Proteins die Abspaltung der Signalsequenz durch den **Signalpeptidase-Komplex**, sofern eine Schnitterkennungsstelle vorhanden ist. Auch kann gegebenenfalls N-Glykosylierung durch den **Oligosaccharyltransferase-Komplex** stattfinden. Beide Enzymkomplexe sind

vermutlich - zumindest im aktiven Translokton - eng mit dem Transportkanal assoziiert. Durch chemische Quervernetzung konnten kürzlich Interaktionen zwischen der beta-Untereinheit des Sec61p-Komplexes (Sec61 β) und der 25 kD-Untereinheit des Signalpeptidase-Komplexes (SPC25) nachgewiesen werden. Diese waren von der Anwesenheit membrangebundener Ribosomen abhängig. Somit scheint die Rekrutierung des Signalpeptidase-Komplexes an das Translokton induziert zu werden, wenn die Translokation durch Ribosomenbindung an die Membran initiiert wird (Kalies et al., 1998). Ähnliches mag für die Rekrutierung des Oligosaccharyltransferase-Komplexes gelten.

2.2.2. Die posttranslationale Translokation

Die posttranslationale Translokation in Eukaryoten ist bislang am besten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) untersucht. Dabei werden die unreifen Vorläuferproteine (Präkursoren) vollständig im Zytosol synthetisiert und vom Ribosom abgelöst, bevor sie durch die ER-Membran transloziert werden (Abbildung 2). Durch Bindung zytosolischer Chaperone der Hsp70-Familie an die Transportsubstrate wird eine vorzeitige Faltung, bei der die Proteine eine transport-inkompetente Konformation annehmen könnten, verhindert. ATP-abhängige Ablösung aus diesen Komplexen kann wiederum zur Freisetzung kurzer, ungefalteter und damit translokationskompetenter Abschnitte der Moleküle führen. Zytosolische Faktoren, die - vergleichbar dem SRP bei der kotranslationalen Translokation - für die Signalsequenzerkennung und das „Targeting“ der Präkursorproteine an die ER-Membran verantwortlich sein könnten, sind für die posttranslationale Translokation bislang nicht bekannt. Mehr weiß man dagegen über die am Transport beteiligten Komponenten in der ER-Membran:

Im Hefesystem konnte gezeigt werden, daß ein Teil der trimeren Sec61p-Komplexe mit dem tetrameren Komplex aus Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p im großen Sec-Komplex assoziiert vorliegt, ein anderer Teil dagegen mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert ist. Während letzterer ein Intermediat des kotranslationalen Transportes repräsentiert, könnte der heptamere Sec-Komplex die Funktionseinheit für den posttranslationalen Transport von Präkursorproteinen darstellen. Panzner et al. (1995) konnten zeigen, daß im Hefesystem für den posttranslationalen Transport *in vitro* der gereinigte Sec-Komplex als einzige Membrankomponente zusammen mit ATP und dem luminalen Hsp70-homologen Protein BiP (= Kar2p in Hefe) als stimulierenden Faktor ausreichend ist.

Quervernetzungsstudien von Plath et al. (1998) deuten darauf hin, daß die Signalsequenz des Präkursorproteins in einer ATP- und BiP-unabhängigen Reaktion von dem multimembran-spannenden Sec61p erkannt und gebunden wird. Die spezifische Bindungsstelle für die Signalsequenz liegt dabei an der Grenzfläche von Lipid und Translokationskanal zwischen den Transmembransegmenten 2 und 7 des Sec61p. Während die Signalsequenz an Sec61p gebunden ist, bildet sie eine Helix aus, deren eine Seite in unmittelbarer Nachbarschaft zu Sec62p und Sec71p gelegen ist. Der C-Terminus des Präkursors konnte zudem mit Sec72p quervernetzt werden. Für die übrigen Komponenten des Sec-Komplexes, Sec63p, Sbh1p und Sss1p konnten dagegen keine Quervernetzungsprodukte nachgewiesen werden.

Da die Transportrichtung nicht wie beim kotranslationalen Transport durch den Komplex aus Ribosom und Translokton vorgegeben wird, muß sie durch andere Mechanismen beeinflusst

werden. In diesem Fall scheint eine Zugfunktion des Hsp70-Chaperons BiP gesichert. In Anwesenheit von ATP bindet BiP im Lumen an die DnaJ-homologe Domäne des Sec63-Proteins (Scidmore et al., 1993; Lyman und Schekman, 1995, 1997) und damit an den Sec-Komplex. Für den Zugmechanismus gibt es im wesentlichen zwei Modellvorstellungen: Die erste, die sog. „Braunsche Ratsche“ („Brownian ratchet“), geht davon aus, daß BiP an bereits translozierte Abschnitte des Proteins bindet und so einen Rücktransport in Richtung Zytoplasma verhindert. Auf diese Weise würde eine ungerichtete Braunsche Bewegung des zu translozierenden Moleküls im Translokationskanal in einen gerichteten Transport verwandelt. Gemäß diesem Modell wäre allerdings die Translokationsrate durch die Rate, mit der sich gefaltete Proteine spontan entfalten, limitiert. Nach dem zweiten, dem sog. „Translokationsmotor-Modell“ könnte BiP an die translozierende Kette binden und durch eine ATP-getriebene Konformationsänderung aktiv ein Stück des gebundenen Proteins durch die Membran ziehen. So würde BiP direkt zur Entfaltung des Präkursors beitragen. Beide Modelle schließen sich nicht notwendig aus. Möglicherweise richtet sich BiP in seiner Funktionsweise danach, ob das Präkursorprotein in mehr oder weniger stark gefalteter Form vorliegt (Schatz und Dobberstein, 1996).

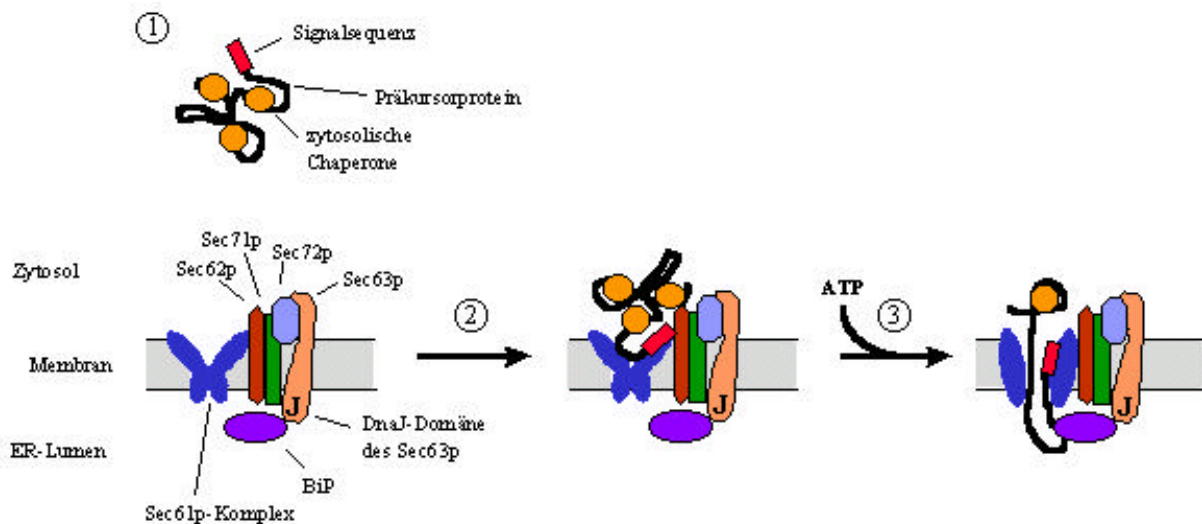


Abbildung 2. Modell der posttranslationalen Translokation. Zytosolische Chaperone der Hsp70-Proteinfamilie binden im Zytosol an Präkursorproteine, die für den Transport durch die ER-Membran vorgesehen sind (Schritt 1). Die Signalsequenz wird in Abwesenheit von ATP von Sec61p erkannt und gebunden (Schritt 2). Die Insertion in den Translokationskanal erfolgt in einer Loop-Struktur, die Signalsequenz interkaliert dabei an der Grenzfläche zwischen Kanal und Lipiden zwischen die Transmembrandomänen 2 und 7 des Sec61p. Die Signalsequenz befindet sich dabei ebenfalls in unmittelbarer Nachbarschaft zu Sec62p und Sec71p, der C-Terminus des Präkursors zusätzlich noch zu Sec72p. Die eigentliche Translokation der Peptidkette wird in einer ATP-abhängigen Reaktion durch das luminaire Hsp70-Protein BiP vermittelt (Schritt 3). Dafür ist eine Wechselwirkung des BiP-Proteins mit der DnaJ-homologen Domäne des Sec63p notwendig. (Schematische Darstellung unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Plath et al., 1998)

2.2.3. Ko- versus posttranslationaler Transport

Der Translokationsmodus eines Proteins wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Zum einen scheinen speziesspezifische Prioritäten zu bestehen, die sich möglicherweise durch die Lebensumstände der Zelle bzw. des Organismus erklären lassen. So sind beispielsweise

einzellige Lebewesen sehr viel größeren Schwankungen ihrer äußeren Umgebung unterworfen, auf die sie schnell und flexibel reagieren müssen. Im Vergleich dazu halten sich die Einflüsse auf eine einzelne Zelle in einem multizellulären Organismus in einem relativ konstanten Rahmen. Auch die Geschwindigkeit der Polypeptidsynthese kann für die Bevorzugung des einen oder anderen Translokationsmodus eine Rolle spielen. Da die Affinität des SRP zur Signalsequenz mit wachsender Kettenlänge abnimmt (Wiedmann et al., 1987), wird bei hoher Syntheserate das Zeitfenster für die Bindung des SRP an die naszierende Kette sehr klein, so daß es zu einer Bevorzugung des posttranslationalen Transportweges kommt.

Überwiegend kotranslationale Translokation von Proteinen durch die ER-Membran findet man in Säugerzellen. Dabei ist nicht auszuschließen, daß es auch in diesen Zellen ein Sec-abhängiges System für die posttranslationale Translokation gibt, das unter bestimmten Bedingungen oder von einer bestimmten Gruppe von Proteinen benutzt werden kann. Mit großer Sicherheit existiert in Säugerzellen ein Sec-unabhängiges posttranslationales Transportsystem, das (zumindest) für die Integration der Gruppe von Membranproteinen verantwortlich ist, die keine Signalsequenz besitzen und über ein carboxyterminal gelegenes hydrophobes Segment in die ER-Membran integriert werden (sog. „tail-anchored proteins“, Kutay et al., 1995).

In *Escherichia coli* (*E. coli*) werden die meisten Proteine posttranslational durch die Zytoplasmamembran transportiert. Dazu bindet das zytosolische Chaperon SecB an vollständig translatierte Vorläuferproteine. SecB interagiert an der Plasmamembran spezifisch mit der zytosolischen ATPase SecA, die wiederum den Transport des Präkursors durch das Translokon vermittelt. Dessen zentrale Einheit wird durch den trimeren SecYEG-Komplex gebildet (vgl. auch Abschnitt 2.3.1). *E. coli* besitzt jedoch mit einer 4,5 S RNA und den Proteinen Ffh und FtsY auch ein SRP/SRP-Rezeptor-homologes System, das ein kotranslationales „Targeting“ an die Plasmamembran ermöglicht. Im heterologen *in vitro*-System konnten SRP und SRP-Rezeptor aus Säugerzellen durch die homologen bakteriellen Komponenten ersetzt werden (Powers und Walter, 1997). Die Membrankomponenten des Translokationskomplexes scheinen für beide „Targeting“-Modi dieselben zu sein (Valent et al., 1998). Neuere Arbeiten zeigten, daß der SRP-Weg überwiegend von einer Gruppe von Plasmamembranproteinen genutzt wird (Macfarlane und Müller, 1995; Ulbrandt et al., 1997).

Für die Hefe *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß ein SRP-abhängiger kotranslatationaler Transportweg und ein SRP-unabhängiger posttranslatationaler Weg parallel in der Zelle existieren. Bei Analysen der Signalsequenzen diverser Präkursorproteine wurde gefunden, daß diese drei distinkte Klassen bilden: Einige Proteine werden SRP-abhängig, andere SRP-unabhängig transportiert, und eine dritte Klasse von Proteinen kann beide Translokationswege benutzen (Ng et al., 1996). Bereits früher wurde beobachtet, daß bei Ausschalten des SRP-abhängigen Weges (durch Deletion einzelner Komponenten des SRP oder des SRP-Rezeptors) nach einiger Zeit eine physiologische Adaptation auftritt: Zellen, die in Abwesenheit von SRP oder SRP-Rezeptor über einen längeren Zeitraum kultiviert wurden, zeigten keine nennenswerten Defekte in der Proteintranslokation mehr. Diese Adaptation wurde nicht durch Suppressormutationen verursacht, sondern war auf einen physiologischen Prozeß zurückzuführen (Ogg et al., 1992). Der SRP-abhängige Translokationsweg kann in diesen Zellen also effektiv umgangen werden. Diese Möglichkeit der Anpassung wird entscheidend dadurch erleichtert, daß beide Wege der Translokation gemeinsame Module wie beispielsweise den die Translokationspore bildenden Sec61p-Komplex nutzen.

2.3. Die Komponenten des Translokationsapparates

2.3.1. Entwicklungsgeschichtliche Konservierung

Die Proteintranslokationssysteme in Membranen gleichen phylogenetischen Ursprungs zeigen sich im Vergleich eukaryotischer und prokaryotischer Zellen hoch konserviert. Das trifft in besonderem Maße für den Proteintransport durch die ER-Membran in eukaryotischen Zellen und den Proteinexport durch die Zytoplasmamembran (innere Membran) in Eubakterien und Archaeobakterien zu.

Konserviert sind nicht nur die am Transport direkt beteiligten Membranproteine und Proteinkomplexe, sondern auch Komponenten, die beispielsweise für das „Targeting“ des Transportsubstrats an die Membran oder für die Prozessierung des transportierten Proteins verantwortlich sind. Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der wichtigsten Komponenten für den Proteintransport durch die eukaryotische ER-Membran bzw. prokaryotische Zytoplasmamembran in den bislang hauptsächlich untersuchten Modellsystemen: Säugerzellen, *S. cerevisiae* und *E. coli*; zusätzlich noch in Archaeobakterien. Diese stehen beispielhaft für die zahlreichen mittlerweile bekannten homologen Gene und Proteine aus Organismen aller drei Reiche: Eukaryoten, Eubakterien und Archaeobakterien. Die weitreichende Konservierung der Translokationssysteme zeigt, daß sich diese Variante des Proteintransports durch Membranen sehr früh in der Evolution entwickelt haben muß.

Ausführlicher eingegangen werden soll an dieser Stelle auf die Komponenten des zentralen Translokationskomplexes, namentlich den die Translokationspore bildenden Sec61-Komplex.

2.3.2. Der trimere Sec61p-Komplex

Der heterotrimere Sec61p-Komplex in Säugerzellen erfüllt, wie bereits in Abschnitt 2.2.2. ausgeführt, im wesentlichen drei Funktionen: die Translokationspore in der ER-Membran wird durch oligomere Ringe des Sec61p-Komplexes gebildet; der Sec61p-Komplex fungiert als Ribosomenrezeptor, und er ist nach dem SRP für einen zweiten Signalsequenz-Erkennungsschritt in der ER-Membran verantwortlich.

Homologe trimere Komplexe zum Säuger-Sec61p-Komplex sind in zahlreichen eukaryotischen und prokaryotischen Organismen gefunden worden. In *Saccharomyces cerevisiae* besteht dieser Komplex aus Sec61p, Sbh1p und Sss1p (Panzner et al., 1995), die homolog zu der α -, β - bzw. γ -Untereinheit des Säuger-Sec61p-Komplexes sind (Görlich et al., 1992b; Hartmann et al., 1994, Panzner et al., 1995). Strukturhomologe Proteine zu Sec61 α /Sec61p bzw. Sec61 γ /Sss1p finden sich bei Bakterien in SecY bzw. SecE. Diese sind Komponenten des heterotrimeren SecYEG-Komplexes, der eine zentrale Rolle im bakteriellen Proteinexport spielt (Stirling et al., 1992, Görlich et al., 1992b, Hartmann et al., 1994). Zwischen Sec61 β /Sbh1p und SecG dagegen besteht keinerlei Homologie. Die in Archaeobakterien gefundenen homologen Proteine der α - und γ -Untereinheit sind ausnahmslos den entsprechenden eukaryotischen Untereinheiten näher verwandt als den eubakteriellen. Auch ein Gen mit Ähnlichkeit zu Sec61 β , aber kein SecG-Homolog wurde in Archaeobakterien gefunden (Pohlschröder et al., 1997).

Funktion	Komponente	Säuger	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i> (Eubakterien)	Archae- bakterien
„Targeting“	SRP	7S-RNA SRP9 SRP14 SRP19 SRP54 SRP68 SRP72	scR1 Srp14p Sec65p Srp21p Srp54p Srp68p Srp72p	4.5S-RNA P48, Ffh	SRP-RNA SRP19 SRP54
	SecB			SecB	
	SRP-Rezeptor (SR)	SR α SR β	SR α (SR101) SR β	FtsY	SR α
Translokation	Sec61-Komplex	Sec61 α Sec61 β Sec61 γ	Sec61p ¹⁾ Sbh1p Sss1p ¹⁾	SecY ¹⁾ SecE ¹⁾ SecG	Sec61 α Sec61 β ³⁾ Sec61 γ
	Sec62/63-Komplex	HTP1 ²⁾ Sec63	Sec62p ¹⁾ Sec63p ¹⁾ Sec71p Sec72p		
	TRAM	TRAMP			
	SecD/F			SecD SecF	SecD SecF
	BiP ⁴⁾	BiP	Kar2p ¹⁾		
	SecA ⁵⁾			SecA ¹⁾	
Prozessierung	Signalpeptidase-Komplex	25 kD, SPC25 22 kD, SPC22/23 21 kD, SPC21 18 kD, SPC18 12 kD, SPC12	Spc2p Spc3p Sec11p " Spc1p	Lep1p "	Sec11
	Oligosaccharyl-transferase-Komplex	Ribophorin I Ost5 Ribophorin II 48 kD, OST48 DAD1 Stt3 N33	64 kD, Ost1p 9,5 kD, Ost5p 30 kD, Swp1p 45 kD, Wbp1p 16 kD, Ost2p 78 kD, Stt3p 3,6 kD, Ost4p 34 kD, Ost3p		 Stt3

¹⁾ essentielles Protein

²⁾ Funktionshomologie bislang nicht nachgewiesen

³⁾ mögliches homologes Protein

⁴⁾ Funktion in Translokation und Faltung

⁵⁾ Funktion in „Targeting“ und Translokation

Tabelle 2. Vergleich der wichtigsten Komponenten für den Proteintransport durch die eukaryotische ER-Membran (Säugerzellen; *S. cerevisiae*) bzw. prokaryotische Zytoplasmamembran (*E. coli*; Archaeobakterien). Homologe Komponenten finden sich in einer Zeile. Quellen: SRP/SRP-Rezeptor: Walter und Johnson, 1994 und darin zitierte Originalia; The Signal Recognition Particle Database (SRPDB, Larsen et al., 1998). Sec-Komponenten/TRAM/BiP: Rapoport et al., 1996 und darin zitierte Originalia; Pohlschröder et al., 1997; Daimon et al., 1997 (HTP1); H.A. Meyer und E.Hartmann, unveröffentlicht (Säuger-Sec63). Signalpeptidase: Meyer und Hartmann, 1997 und darin zitierte Originalia. Oligosaccharyltransferase: Silberstein und Gilmore, 1996 und darin zitierte Originalia; MacGrogan et al., 1996; Karaoglu et al., 1997; Smith et al., 1997; Zambrowicz et al., 1998.

Der Grad der Homologie differiert für die einzelnen Proteinuntereinheiten der trimeren Komplexe. Am stärksten konserviert sind die α -Untereinheiten. Säuger Sec61 α und Sec61p aus *S. cerevisiae* weisen 55% identische Aminosäurereste bezogen auf die Gesamtsequenz auf; in einzelnen Transmembransegmenten und zytoplasmatischen Loops ist die Ähnlichkeit noch weit größer (Görlich et al., 1992b). Die Topologie dieser multimembranspannenden Proteine wurde für SecY und Sec61p aus Hefe experimentell bestimmt (Akiyama und Ito, 1987; Wilkinson et al., 1996), für Sec61 α aus Säuger wurden mit Hilfe unterschiedlicher Computerprogramme aufgrund von Hydropathie-Plots Vorhersagen erstellt (Görlich et al. 1992b). In allen Fällen ergab sich übereinstimmend, daß es sich bei SecY wie auch bei Sec61 α aus Säuger und Sec61p aus Hefe um Proteine handelt, die zehn transmembranspannende Segmente aufweisen und deren N- und C-Terminus sich im Zytoplasma befinden. Die multimembranspannenden α -Untereinheiten sind daher geradezu prädestiniert für die Bildung der Translokationspore.

Die β - und γ -Untereinheiten der trimeren Komplexe in Hefe und Säuger durchspannen die Membran jeweils einfach. Sie gehören zu den Typ-II Membranproteinen, deren C-Terminus sich im Lumen des ER befindet, und zudem zu der Gruppe von ER-Proteinen ohne N-terminale Signalsequenz, die über ein C-terminal gelegenes hydrophobes Segment Sec61-unabhängig in die Membran inserieren (Hartmann et al., 1994). Das Säuger-Sec61 γ und Sss1p aus Hefe sind mit 43% identischen Aminosäureresten relativ stark konserviert, das Säugerprotein kann in Hefezellen die Funktion des Sss1p ersetzen (Hartmann et al., 1994). Sss1p bindet im Bereich der Transmembransegmente 6-8 an Sec61p (Wilkinson et al., 1997). Die Bindungsstelle überlappt somit vermutlich mit der für die Signalsequenz des Transportsubstrats (Plath et al., 1998). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, daß das Sss1p als Ersatz-Signalsequenz fungieren könnte, wenn in Abwesenheit eines Translokationssubstrates der Kanal in seiner geschlossenen Form vorliegt. Die Signalsequenz eines Präkursorproteins könnte das Sss1p von der Sec61p-Bindungsstelle verdrängen und damit den Kanal für den Polypeptidtransport öffnen. Dem Sss1p würde damit die wichtige Aufgabe zufallen, den translokationsinaktiven Kanal zu verschließen (Plath et al., 1998). Sec61 β und Sbh1p zeigen von allen Untereinheiten der trimeren Komplexe die geringste Ähnlichkeit zueinander, nur 22% der Aminosäurereste sind identisch. Die von der Größe her mittlere Untereinheit des homologen SecY-Komplexes in *Escherichia coli*, SecE, weist sogar keinerlei Ähnlichkeit mit den eukaryotischen beta-Untereinheiten auf.

Im Grad ihrer Konserviertheit spiegelt sich die (Un-)Entbehrlichkeit der Proteine für die Funktion der Zelle wider; rückblickend läßt sich somit auch die Reihenfolge der Entdeckung, der Hefeproteine verstehen:

Bereits in den achtziger Jahren wurde in Hefe in genetischen Screens auf Defektmutanten in der Sekretion Sec61p als ein an der Translokation in das ER beteiligtes Protein identifiziert (Deshaies und Schekman, 1987). Etliche Präkursoren sekretorischer oder vakuolärer Proteine akkumulierten bei nicht-permissiver Temperatur in der untersuchten temperatur-sensitiven (ts-)Mutante. Deletion des SEC61-Gens ist für die Hefezelle letal.

Dies gilt ebenso für die Deletion des Hefegens SSS1, jedoch wurde Sss1p nicht in einem Screen auf Sekretionsmutanten gefunden, sondern als Multicopy-Suppressor des sec61-ts-Allels (Sss1 steht für Sec sixty-one suppressor 1; Esnault et al., 1993). Depletion des Proteins mit Hilfe eines regulierbaren Promotors vor dem SSS1-Gen führte zur Akkumulation diverser sekretorischer und vakuolärer Proteine im Zytoplasma.

Die dritte Komponente in Hefe wurde nicht durch genetische Screens, sondern durch chromatographische Reinigung des ribosomen-assoziierten Sec61p-Komplexes gefunden und als homologes Protein der β -Untereinheit des trimeren Sec61p-Komplexes aus Säugern identifiziert (Sbh1 = Sec61 β homolog 1; Panzner et al., 1995).

Die Identifizierung der entsprechenden Säugerproteine gelang wie bereits oben genannt durch photochemische Quervernetzungsexperimente (Sec61 α ; Görlich et al., 1992b) und Reinigung des trimeren Komplexes aus Hundepankreas (Sec61 β und - γ ; Görlich und Rapoport, 1993).

2.3.3. Der heptamere Sec-Komplex

In *S. cerevisiae* findet sich außer dem trimeren Sec61p-Komplex der heptamere Sec-Komplex (vgl. auch Abschnitt 2.2.2.), der sich aus dem trimeren Sec61p-Komplex und dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex zusammensetzt. Letzterer besteht aus den Membranproteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p (Panzner et al., 1995), von denen SEC62 und SEC63 als essentielle Gene in Screens auf Defektmutanten in der Translokation von Proteinen gefunden wurden (Rothblatt et al., 1989). Sec71p und Sec72p wurden sowohl in genetischen Screens (Green et al., 1992; Kurihara und Silver, 1993) als auch biochemisch als Proteine, die mit Sec62p und Sec63p assoziiert vorliegen, entdeckt (Deshaies et al., 1991; Feldheim et al., 1993; Feldheim und Schekman, 1994). Beide Proteine sind nicht essentiell für die Zelle. Die Deletion des SEC71-Gens führt zur Abwesenheit sowohl des Sec71- als auch des Sec72-Proteins und zeigt phänotypisch ein temperatur-sensitives Wachstum und Translokationsdefekte (Fang und Green, 1994). Deletion des SEC72-Gens resultiert nicht in einem Wachstumsphänotyp aber in der Akkumulation einiger Präkursorproteine (Fang und Green, 1994; Feldheim und Schekman, 1994). Panzner et al. (1995) konnten zeigen, daß sich mit Hilfe des heptameren Sec-Komplexes der posttranslationale Transport von Proteinen im Hefesystem rekonstituieren läßt. Für einen effizienten Transport ist zudem die Anwesenheit von ATP und von luminalem Kar2p (BiP) notwendig.

Möglicherweise existieren ähnliche Komplexe auch in anderen Organismen: Für das Sec62p wurde ein homologes Protein in *Drosophila*, Dtrp1 (**D**rosophila **t**ranslocation **p**rotein 1), identifiziert, das nicht nur ein Struktur-, sondern sogar ein Funktionshomologes darstellt (Noel und Cartwright, 1994). Daimon et al. (1997) beschrieben die cDNA eines humanen Gens HTP1 (**H**uman **t**ranslocation **p**rotein 1) kodierend für ein Protein, das eine Identität von 36,3% (Ähnlichkeit von 64,6%) zum Dtrp1 aufweist. Die Transkription dieses Gens konnte in Gewebeproben diverser Organe nachgewiesen werden. Auch ein mögliches Sec63p-Homologes im Menschen wurde gefunden (H.A. Meyer und E. Hartmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Für Sec71p oder Sec72p dagegen wurden bislang keine homologen Proteine entdeckt.

2.4. Paraloge SEC61-Gene in Eukaryoten - Problemstellung

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die starke entwicklungsgeschichtliche Konservierung der zentralen Komponenten des Translokationsapparates für den Proteintransport durch die ER-Membran dargelegt. Überraschend finden sich in einigen eukaryotischen Organismen innerhalb einer Spezies zwei homologe SEC61-Gene.

Zur begrifflichen Abgrenzung von Homologen zwischen verschiedenen Spezies, die man als ortholog bezeichnet, spricht man innerhalb einer Spezies von paralogen Genen bzw. Proteinen (Fitch, 1970). Letztere lassen sich auf eine entwicklungsgeschichtlich zurückliegende Gen-duplikation zurückführen und haben sich im folgenden parallel weiterentwickelt.

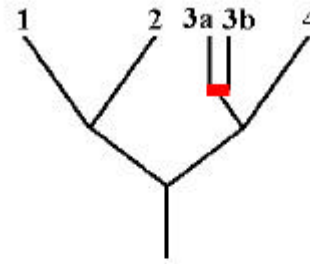


Abbildung 3. Schema zur Verdeutlichung der Begriffe homolog, ortholog und paralog. Beispielhaft gezeigt ist ein Dendrogramm für fünf homologe Gene (und ggf. deren Genprodukte) aus vier Organismen. Der rote Querbalken markiert ein Genduplikationsereignis. Die Gene 3a und 3b finden sich innerhalb eines Organismus und sind somit paralog zueinander. Gen 3a und Gen 3b sind jeweils ortholog zu den Genen 1, 2 und 4.

Im Falle des SEC61 wurden paraloge Gene sowohl in diversen Säugerzellen und in Forelle (Görlich et al., 1992b; S. Prehn und E. Hartmann, unveröffentlicht) als auch in der Hefe *S. cerevisiae* (Feldmann et al., 1994) gefunden. Stellt man nun die Frage nach der funktionellen Bedeutung paraloger Sec61-Proteine für die Zelle bzw. den Organismus, so ist keine für alle oben genannten Fälle gültige Antwort zu erwarten. Denn während beispielsweise in Säugerzellen die beiden paralogen SEC61alpha-Gene und erst recht die Proteine ein hohes Maß an Übereinstimmung zeigen, unterscheiden sich in der Hefe die beiden Sec61-Proteine sehr deutlich voneinander. Somit kann sich die Untersuchung des Phänomens paraloger SEC61-Gene in den genannten Eukaryoten nicht beispielhaft auf einen Organismus beschränken.

Die vorliegende Arbeit untersucht die paralogen SEC61-Gene und -Proteine in Säugerzellen und in *S. cerevisiae* und gibt damit erste Antworten auf die Frage nach der funktionellen Bedeutung der paralogen Sec61-Proteine. Bedingt durch die jeweils spezifische Ausgangssituation im Säuger und in der Hefe mußte dabei eine unterschiedliche Vorgehensweise gewählt werden.

Die vorliegende Arbeit untersucht die paralogen SEC61-Gene und -Proteine in Säugerzellen und in *S. cerevisiae* und gibt damit erste Antworten auf die Frage nach der funktionellen Bedeutung der paralogen Sec61-Proteine. Bedingt durch die jeweils spezifische Ausgangssituation im Säuger und in der Hefe mußte dabei eine unterschiedliche Vorgehensweise gewählt werden.

Die Experimente im Säugersystem sollten zeigen, daß es sich bei der SEC61-Variante um ein funktionell exprimiertes Gen und nicht um ein Pseudogen handelt. Außerdem konnte in diesem multizellulären Organismus die Möglichkeit der zell- oder gewebespezifischen Expression der beiden paralogen Gene überprüft werden.

In der Hefe *S. cerevisiae* sollte detailliert analysiert werden, ob das gefundene paraloge Protein Ssh1p (für Sec sixty-one homolog 1) eine dem Sec61p vergleichbare Rolle bei der Proteintranslokation durch die ER-Membran spielt. Einige der dafür zu untersuchenden Aspekte waren beispielsweise die Lokalisation des Proteins und dessen Entbehrlichkeit für das Wachstum der Zelle im allgemeinen und den Proteintransport im besonderen. Des weiteren wurde gefragt, ob das Ssh1p mit denselben Komponenten des Translokationsapparates assoziieren kann wie Sec61p oder möglicherweise mit anderen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob auch zu den anderen beiden Untereinheiten des trimeren Sec61-Komplexes paraloge Gene und Proteine existieren. Im Rahmen der Charakterisierung des Ssh1p wurde zudem die Bedeutung der beta-Untereinheiten für die Proteintranslokation durch die ER-Membran näher untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Zwei SEC61 α -Gene in Säugerzellen

Nach der Entdeckung des Sec61 α p in Säugerzellen wurden im Zuge der Klonierung des dafür kodierenden Gens überraschend auch Teilsequenzen gefunden, die auf die Existenz eines zweiten, paralogen SEC61 α -Gens hindeuteten (Görlich et al., 1992b). In Abgrenzung zum SEC61 α -I-Gen, das für das bekannte Sec61 α -Protein kodiert, wird im folgenden das paraloge Gen mit SEC61 α -II bezeichnet. Beide Gene wiesen in den vorhandenen Teilsequenzen ein hohes Maß an Identität auf, jedoch wurde beim „Screening“ von cDNA-Banken diverser Säugerspezies nicht ein einziger vollständiger Klon des SEC61 α -II-Gens gefunden. Dabei gab es unter den isolierten Klonen nicht nur unvollständige, sondern auch falsch gespleißte mit fehlendem Exon, Rasterschub oder nicht-herausgeschnittenem Intron. Abbildung 4 zeigt schematisch die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Klone aus drei cDNA-Banken.

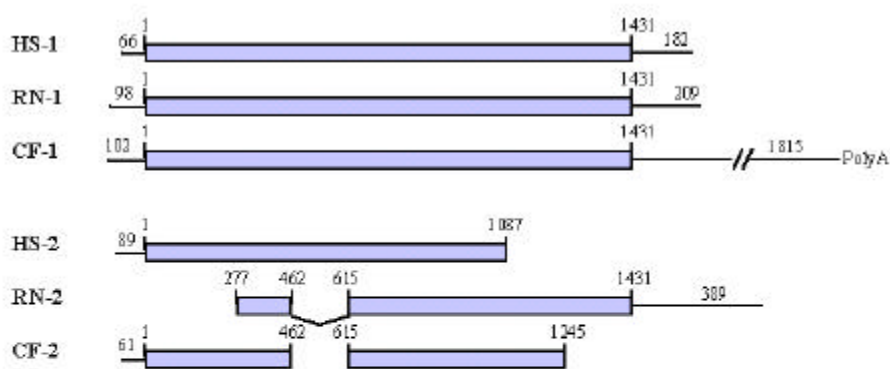


Abbildung 4. Übersicht über die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Klone der beiden SEC61 α -Gene aus drei Säugerspezies. Die Klone der beiden humanen Gene HS-SEC61 α -I und -II (HS-1 und HS-2) stammen aus dem Screening einer cDNA-Bank aus HeLa-Zellen, die Sequenzen der Gene RN-SEC61 α -I

und -II (RN-1 und RN-2) aus dem Screening einer cDNA-Bank aus Ratten-Leber und die Sequenzen der Gene CF-SEC61 α -I und -II (CF-1 und CF-2) aus dem Screening einer cDNA-Bank aus MDCK-Zellen (Madin-Darby-canine kidney-Zellen). RN-2 ist ein falsch gespleißter Klon mit Rasterschub. CF-2 sind zwei einzelne, unvollständige Klone. Balken markieren kodierende Sequenzabschnitte, Linien die flankierenden nicht-kodierenden Bereiche. Die Länge der jeweiligen Abschnitte ist durch die Anzahl der Nukleotide angegeben. Der vollständig kodierende Bereich ist für beide Gene 1431 bp (Basenpaare) lang.

3.1.1. Vergleich der Nukleinsäure- und Proteinsequenzen

Um einen Sequenzvergleich der paralogen SEC61 α -Gene im gesamten kodierenden Bereich und auf Proteinebene zu ermöglichen, war es notwendig, die Teilsequenzen der SEC61 α -II-Gene zu ergänzen. Zudem warf das Auffinden von ausschließlich unvollständigen Klonen des SEC61 α -II-Gens in den untersuchten cDNA-Banken die Frage auf, ob für dieses Gen überhaupt ein durchgängiges offenes Leseraster („open reading frame“, ORF) existiert, von dem das Gen in voller Länge transkribiert werden könnte. Daher wurde in einem ersten Schritt überprüft, ob sich die fehlenden Sequenzabschnitte mittels der Methode der RT-PCR (reverse transcribed-polymerase chain reaction) nachweisen ließen. Dazu wurde RNA aus

verschiedenen Säugerzellen revers transkribiert und die resultierende cDNA (komplementäre DNA) als Ausgangspunkt für die Amplifikation der ausgewählten Sequenzabschnitte durch PCR benutzt. Genabschnitte im Bereich des Stop-Kodons sowie der 3'-nicht-translatierten Regionen wurden durch die Methode des 3'-race (vgl. Abschnitt 5.2.6.) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend über ein Agarose-Gel gereinigt und sequenziert.

Auf diese Weise konnte die Sequenz des humanen SEC61 α -II-Gens vervollständigt und nachfolgend ein Klon in voller Länge generiert werden. Für die entsprechenden Gene in Ratte und Hund ließ sich der fehlende Sequenzabschnitt zwischen Nukleotid 462 und 615 (vgl. Abb. 4) durch die RT-PCR amplifizieren. Darüber hinaus wurden mit gleicher Methode die Sequenzen der beiden SEC61 α -Gene aus Maus ermittelt (jeweils mit Ausnahme des äußersten 5'-kodierenden Bereiches). Komplettiert werden diese durch kürzlich in der NCBI GenBank publizierte EST (expressed sequence tag)-Sequenzen (vgl. Legende zu Abb. 5). Somit liegt zum jetzigen Zeitpunkt die vollständige Sequenzinformation der beiden paralogen SEC61 α -Gene, sowohl für den Menschen als auch für die Maus, vor. Die Lokalisation der beiden humanen Gene konnte mit Hilfe der NCBI-Datenbank ebenfalls ermittelt werden: Das SEC61 α -I-Gen ist auf Chromosom 3, das SEC61 α -II-Gen auf Chromosom 10 lokalisiert.

Die ergänzten Sequenzen in den vier genannten Säugerspezies wurden für den Vergleich der SEC61 α -Gene und im weiteren der davon kodierten Proteine zugrunde gelegt. Abbildung 5 zeigt den Vergleich auf Nukleinsäureebene beispielhaft für die kodierenden Bereiche der beiden paralogen SEC61 α -Gene aus Maus. Ein Vergleich der SEC61 α -Gene aller vier untersuchten Säugerspezies findet sich unter 6.2. im Anhang.

Das SEC61 α -II-Gen zeichnet sich durch eine außerordentlich hohe Konserviertheit im Vergleich der verschiedenen Spezies aus, was entschieden gegen die Annahme eines Pseudogens spricht. So findet man auf Nukleinsäureebene bei den beiden paralogen SEC61 α -Genen innerhalb einer Spezies zwischen 77 und 79 % identische Nukleotide, während das

Ausmaß der Identität im Vergleich der vier Säugerspezies für die homologen SEC61 α -I-Gene 85 - 90 % und für die homologen SEC61 α -II-Gene sogar bis zu 94 % beträgt.

Die acht untersuchten SEC61 α -Gene wurden auch hinsichtlich ihres GC-Gehaltes analysiert. Wie Tabelle 3 zeigt, weisen die homologen SEC61 α -I-Gene durchweg einen GC-Gehalt von über 50% auf, während der GC-Gehalt der SEC61 α -II-Gene für alle vier untersuchten Spezies unter 50% liegt.

Tabelle 3. GC-Gehalt der untersuchten Säuger-SEC61 α -Gene

Säugerspezies	GC-Gehalt	
	SEC61 α -I	SEC61 α -II
Mensch	51 %	46 %
Hund	53 %	43 % ^{a)}
Ratte	53 %	49 % ^{b)}
Maus	53 %	46 %

^{a)} Nukleotide 1 - 1245 des kodierenden Bereiches

^{b)} Nukleotide 277 - 1431 des kodierenden Bereiches

Noch deutlicher wird die starke Konserviertheit auf Proteinebene: Die Sec61 α -I-Proteine wie auch die Sec61 α -II-Proteine sind - soweit die Sequenzen bekannt sind - im Vergleich der verschiedenen Spezies zu 100 % konserviert (mit einer Ausnahme: das Sec61 α -I-Protein aus dem Hund weist an Position 343 einen Austausch - Histidin statt Tryptophan - im Vergleich zu allen übrigen Sec61 α -Proteinen auf). Im Vergleich zwischen Sec61 α -Ip und Sec61 α -Iip finden sich 31 konservierte Austausche bei einer Gesamtlänge von 476 Aminosäureresten, das entspricht einer Identität der beiden Proteine von 93,5 % (Abbildung 6). Die Austausche finden sich über das gesamte Protein verteilt, etwa ein Drittel davon liegen in dem gemäß der

MM-1	ATGCGCATCAAATTTCTGGAAGTCATCAAGCCATTCTGTGTCTATCTTGCCGGAAATTCAGAAGCCAGAGA	70
MM-2	ATGGGCATCAAGTTTTTAGAAGTTATTAACCTTTCTGTGCAGTTCTACCAGAAATTCAGAAGCCTGAAA	
MM-1	GAAAGATTTCAGTTTAAGGAGAAAAGTTCTGTGGACAGCCATCACCTCTTTCATCTTCTTAGTATGCTGTCA	140
MM-2	GGAAAATTTCAGTTTAGAGAGAAGGTACTATGGACTGCTATAACACTCTTCATTTTCTTAGTATGCTGTCA	
MM-1	GATCCCCCTGTTTGGCATCATGTCTTCAGACTCAGCTGACCCGTTCTACTGGATGCGAGTGATTCTGGCC	210
MM-2	GATTCCGCTGTTTGGGATCATGTATCGGACTCTGCAGATCCCTTCTACTGGATGAGAGTTATTCTTGCA	
MM-1	TCTAACAGAGGTACCTTAATGGAGCTGGGCATCTCTCCTATTGTACCTCCGGTCTTATCATGCAGCTCT	280
MM-2	TCCAACAGAGGAACATTGATGGAATTGGGTATTCCCAATTGTAACGCTGGTTTGATTATGCAGTTGT	
MM-1	TAGCTGGTGCCAAGATAATTGAAGTTGGGGACACCCGAAAGACCGAGCTCTCTCAATGGAGCCCAGAA	350
MM-2	TAGCTGGAGCCAAAATCATTGAAGTTGGAGACACCCAAAGATAGAGCTCTGTTCAATGGAGCCCAGAA	
MM-1	GTTGTTTGGAAATGATCATTACTATCGGTGAGTCCATTGTGTATGTGATGACGGGCATGTACGGGGACCC	420
MM-2	ATTATTTGGTATGATCATTACCATTTGGGAAGCCATTGTGTATGTGATGACGGGCATGTACGGGGACCC	
MM-1	TCGGAGATGGGTGCTGGAATCTGCCTGCTGATCACCATTAGCTCTTTGTTGCTGGCTTAATTGTCTTAC	490
MM-2	GCGGAAATGGGTGCTGGGATCTGTCTCCTTATCATTATTCAGTTGTTTGTGCTGGTTTGATTGTGCTGC	
MM-1	TTTTGGATGAACCTCTGCAAAAAGGGTACGGCTTGGGCTCTGGCATTTCTCTCTTCATTGCGACTAACAT	560
MM-2	TGTTAGATGAGCTGCTACAGAAGGGTTACGGCTTGGGGTCTGGGATTTCCCTCTTTATTGCCACCAACAT	
MM-1	CTGTGAGACCATTGTGTGGAAGGCATTGAGCCCCACCCTGTCAACACTGGCCGAGGGATGGAATTCGAA	630
MM-2	CTGTGAGACCATTGTCTGGAAGGCCTTTAGTCCCCTACCATTAACACTGGCAGAGGTACGGAGTTTGAA	
MM-1	GGCGCCATCATAGCGCTATTCCACCTGCTGGCCACCCGCACAGACAAGGTCCGAGCCCTTCGAGAGGCAT	700
MM-2	GGTGCAGTCATAGCTCTGTTTCATTTGCTGGCCACCAGGACAGACAAGGTGCGAGCCCTTGAGGGAGGCTT	
MM-1	TCTACCGCCAGAACCTCCCCAACCTCATGAACCTGATTGCCACCATCTTCGTCTTTGCGCTTGTCTATCTA	770
MM-2	TCTATAGGCAGAACCTCCCCAACCTCATGAACCTCATCGCCACAGTGTTGCTGTTGCTGTCTGCTATCTA	
MM-1	TTTCCAGGGCTTCCGAGTGGACCTTCCAATCAAGTCGGCGCGTTACCGAGGCCAGTACAACACCTATCCC	840
MM-2	TTTTCCAGGGGTTTTCGTGTGACTTGCCCATTAAGTCGGCACGGTATCGTGGACAGTACAGTAGCTATCCT	
MM-1	ATCAAGCTCTTCTACACCTCCAACATCCCCATCATCTTGAGTCTGCTCTGGTGTCCAACCTGTATGTCA	910
MM-2	ATCAAGCTCTTCTACACGTGGAATATTCACATAATCCTTCAGTCTGCCCTAGTTTCAAACTTGTACGTCA	
MM-1	TCTCCCAGATGCTGTGTCAGCACGCTTCAGTGGCAACCTGCTGGTTAGCCTGCTGGGCACCTGGTCCGATAC	980
MM-2	TTTCCCAGATGCTGTCTGTTTCGATTTAGTGGCAACTTCTTAGTAACTTACTAGGACAGTGGGCCGATGT	
MM-1	ATCATCTGGGGGCCAGCCGAGCTTACCCCGTTGGTGGCCTGTGTTACTACCTGTCTCTCCGGAATCG	1050
MM-2	CAGTGGGGGAGGGCCTGCTCGCTCTACCTGTTGGCGGCCTTTGTTACTATCTGTCTCTCTCTGAGTCT	
MM-1	TTCCGGCTCAGTGTGAGAGACCCCTGTCCATGCGGTGCTGTACATCGTGTTCATGCTGGGCTCCTGTGCAT	1120
MM-2	ATGGGAGCCATATTGAGGATCCGTTCATGTAGTTGTATATATTATCTTCATGTTGGGGTCATGTGCAT	
MM-1	TCTTCTCCAAAACATGGATCGAAGTCTCAGGTTCTTCTGCCAAAGATGTTGCAAAGCAGCTGAAGGAGCA	1190
MM-2	TCTTTTCTAAGACGTGGATAGAAGTTTCTGGTTCTTCAGCCAAAGATGTGGCCAAAGCACTTAAAGAACA	
MM-1	GCAGATGGTGATGAGGGGCCACAGGGAGACCTCCATGGTGCATGAGCTCAACCGGTACATCCCCACAGCC	1260
MM-2	GCAGATGGTGATGAGGGGTACAGAGATACCTCCATGGTCCATGAGCTGAACAGGTACATCCCCACAGCA	
MM-1	GCAGCCTTTGGTGGGCTGTGCATTGGGGCCCTCTCTGTCTGGCTGACTTCCTGGGTGCTATCGGGTCTG	1330
MM-2	GCTGCCTTTGGGGGTCTGTGCATCGGTGCCCTGTGAGTACTAGCAGACTTCCTTGGGGCCATTGGCTCTG	
MM-1	GAACTGGGATCCTGCTTGCGGTCAACCATCATCTACCAGTACTTTGAGATCTTCGTCAAGGAACAGAGCGA	1400
MM-2	GTACTGGAATTCTGCTTGCAAGTCACTATTATTATCAGTATTTTGAAATATTTGTTAAGGAACAGGCTGA	
MM-1	GGTGGGCAGCATGGGAGCCCTTCTCTTCTGA	1431
MM-2	AGTTGGTGGAAATGGGTGCTTTGTTTCTAA	

Abbildung 5. Vergleich der DNA-Sequenzen der kodierenden Region des SEC61 α -I-Gens (MM-1) und des SEC61 α -II-Gens (MM-2) der Maus. Identische Nukleinsäurereste sind grau unterlegt. Unterstreichungen mit einer Wellenlinie markiert Genabschnitte, deren Sequenzinformation aus ESTs (expressed sequence tags) stammt, die in der GenBank des NCBI veröffentlicht sind (Marra, M. et al., Mouse EST Project; für MM-1: Acc.No. AA410008 und AA245328; für MM-2: Acc.No. AI006571).

Hydrophobizitätsanalysen vorhergesagten luminalen Loop zwischen den Transmembranregionen sieben und acht (TM7 und TM8). Bei der Mehrzahl der Austausche handelt es sich um sehr ähnliche Aminosäurereste.

Sec61α-Ip	MAIKFLEVIKPF CV ILPEIQKPERKIQF RE KVLWTAITL FIFLVCCQ IPL	50
Sec61α-IIp	MGIKFLEVIKPFCAVLP EL PEIQKPERKIQF RE KVLWTAITL FIFLVCCQ IPL	
Sec61α-Ip	FGIMSSDSADPFYWMRVILASNRG T LMELGISPIVTSGLIMQ LLAGAKII	100
Sec61α-IIp	FGIMSSDSADPFYWMRVILASNRG T LMELGISPIVTSGLIMQ LLAGAKII	
Sec61α-Ip	EVGDTPKDRALFNGAQK LFGMIITIGQ S IVYVMTGMYGDP SEM GAGICLL	150
Sec61α-IIp	EVGDTPKDRALFNGAQK LFGMIITIGQ A IVYVMTGMYGDP PAE MGAGICLL	
Sec61α-Ip	ITIQLFVAGLIV LLLDELLQKG YGLGSGISLFI ATNICETIVWKA FSP TT	200
Sec61α-IIp	ITIQLFVAGLIV LLLDELLQKG YGLGSGISLFI ATNICETIVWKA FSP TT	
Sec61α-Ip	VNTGRGMEFEGATIALFHL L ATRTDKVRALREAFYRQNL P NLMN LIAT TF	250
Sec61α-IIp	INTGRGTEFEGAVIALFHL L ATRTDKVRALREAFYRQNL P NLMN LIAT VF	
Sec61α-Ip	VFAVVIYFQGF RVLDLPIKSARYRGQYNTYPIKLFYTSN IP ILQ SALV SN	300
Sec61α-IIp	VFAVVIYFQGF RVLDLPIKSARYRGQYSSYP IK LFYTSN IP ILQ SALV SN	
Sec61α-Ip	LYVISQMLS ARFSGNLLVSL L GTWSDTSSGGPARAYPVGG L CYYLSP P ES	350
Sec61α-IIp	LYVISQMLS VRFSGNFLVN L LQWADVSGGGPARSY P VGG L CYYLSP P ES	
Sec61α-Ip	FGSVLEDPVH AVVYI IF FMLGSCAFF SKTWIEVSGSSAKDVAKQLKEQQMV	400
Sec61α-IIp	MGAIFEDPVH VVYI IF FMLGSCAFF SKTWIEVSGSSAKDVAKQLKEQQMV	
Sec61α-Ip	MRGHR E TSMVHELNRYIPTAA AF GGLCIGALS V LADFLGAIGSGTG I LLA	450
Sec61α-IIp	MRGHR E TSMVHELNRYIPTAA AF GGLCIGALS V LADFLGAIGSGTG I LLA	
Sec61α-Ip	VTIIYQYFEIFVKEQ SE VGSMGALL F	476
Sec61α-IIp	VTIIYQYFEIFVKEQ AE VGSMGALL F	

Abbildung 6. Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Sec61α-Proteine, die durch die Gene SEC61α-I und SEC61α-II in Säugerzellen kodiert werden. Fett gedruckte Sequenzen markieren membranspannende Segmente, farbig markierte Aminosäurereste kennzeichnen Unterschiede zwischen beiden Sequenzen

Die Sequenzanalysen konnten somit zum einen zeigen, daß das SEC61α-II-Gen einen durchgängigen ORF besitzt, zum anderen konnte nachgewiesen werden, daß die Austausche zwischen den beiden paralogen Sec61α-Proteinen in allen untersuchten Spezies konserviert sind. Das SEC61α-II-Gen unterliegt also offenbar ebenfalls einem Selektionsdruck. Beide Argumente sprechen dafür, daß es sich bei dem SEC61α-II-Gen nicht um ein Pseudogen, sondern um ein funktionell exprimiertes Gen handelt. Damit stellt sich die Frage nach der Bedeutung zweier nahezu identischer Proteine für die Zelle bzw. den Organismus. Gleichzeitig werden die Schwierigkeiten bei der Untersuchung offenbar: Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine zwischen den beiden Proteinen differenzierende Peptidantikörper zur Verfügung standen, wurde der Versuch unternommen, auf RNA-Ebene per Northern Blotting zu einer differenzierenden Analyse zu gelangen, was jedoch nicht erfolgreich war. Erst mit der bereits oben genannten Methode der RT-PCR gelang es, zwischen den beiden SEC61α-Transkripten zu unterscheiden, und so die Expression beider Gene zu untersuchen.

3.1.2. Analyse der Expression beider SEC61 α -Gene mittels RT-PCR

Die Expression der beiden SEC61 α -Gene wurde in einer ersten Auswahl verschiedener Organe (Hirn, Herz, Niere, Leber und Milz) und acht Embryonalstadien (Tag 8,5 bis Tag 15,5) der Maus sowie diversen Zelllinien und zwei Primärkulturen (Astrozyten und Hippocampusneuronen) unterschiedlicher Spezies untersucht. Dazu wurde aus den Geweben und Zellen RNA isoliert und revers transkribiert. Die resultierende cDNA war Ausgangspunkt für PCR-Reaktionen mit für die beiden Gene jeweils spezifischen (= typ-spezifischen) Primerpaaren. Die resultierenden PCR-Produkte wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, daraus isoliert und durch Sequenzierung auf ihre Typ-Spezifität hin überprüft. In allen Fällen erhielt man bei Einsatz typ-spezifischer Primer eindeutig entweder Fragmente des SEC61 α -I-Gens oder des SEC61 α -II-Gens. In den Kontrollansätzen mit gemischten Primerkombinationen, d.h. ein Primer spezifisch für das SEC61 α -I-Gen und der zweite spezifisch für das SEC61 α -II-Gen, waren keine PCR-Produkte nachweisbar (nicht gezeigt). Weiterhin wurde kontrolliert, ob die PCR-Produkte tatsächlich auf revers transkribierte RNA zurückgingen und nicht auf möglicherweise kontaminierende genomische DNA in den RNA-Präparationen: Für jede eingesetzte RNA wurde bei der reversen Transkription parallel ein Kontrollansatz mitgeführt, der alle Bestandteile für die Reaktion mit Ausnahme der Reversen Transkriptase enthielt. Die anschließenden PCR-Reaktionen mit Material aus den Kontrollansätzen ergaben in keinem Fall ein PCR-Produkt (nicht gezeigt). Dies zeigt, daß das SEC61 α -II-Gen tatsächlich transkribiert und daher sehr wahrscheinlich auch translatiert wird. Somit erlaubt die hier gewählte Methode der RT-PCR eine differenzielle Analyse der beiden Gene in den untersuchten Zellen und Geweben.

Bekannter Nachteil dieser semi-quantitativen Methode ist es, daß sie lediglich relative Mengenabschätzungen der beiden Transkripte im Vergleich verschiedener Gewebe und Zellen erlaubt, da die Menge des gebildeten PCR-Produktes nicht allein von der Menge der zu amplifizierenden cDNA, sondern von einer Reihe weiterer, sehr unterschiedlicher Faktoren abhängt. Dabei spielen nicht nur die Länge des zu amplifizierenden Bereichs und die Faltung des Ausgangsmoleküls, sondern auch die Primer selbst eine entscheidende Rolle. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten einige der verwendeten Primer beispielsweise eine sehr hohe, von der Sequenz her nicht erwartete Speziespezifität, so daß sich allein deswegen ein direkter Vergleich der gebildeten Mengen an PCR-Produkt zwischen den beiden SEC61 α -Genen verbietet, auch wenn die Primer aus den jeweils identischen Bereichen stammen. Verschärft wird der Einfluß dieser Faktoren auf die Menge an PCR-Produkt dadurch, daß es sich bei dieser Reaktion nicht um eine lineare, sondern eine exponentielle Amplifikation handelt. Aus diesem Grund wurde die Zahl der Reaktionszyklen möglichst klein gehalten.

Die Expression der beiden SEC61 α -Gene in den untersuchten Zellen und Geweben wurde mit Primerkombinationen analysiert, die zur Amplifikation unterschiedlicher Bereiche der kodierenden Region beider Gene führten. Eine Übersicht der verwendeten Primerkombinationen einschließlich der Kontrollen ist in Abschnitt 5.2.5. gezeigt. Die Ergebnisse der Analysen für die einzelnen Gene waren für unterschiedliche Fragmente reproduzierbar, das Mengenverhältnis der Amplifikationsprodukte von SEC61 α -I und SEC61 α -II war allerdings aus den bereits oben genannten Gründen nicht stabil.

In Abbildung 7 ist beispielhaft das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse der beiden Gene mit typ- und speziespezifischen Primern, die die Amplifikation nahezu der gesamten kodierenden Region der beiden Gene erlauben, gezeigt. Als interner Standard für die Vergleichbarkeit der

eingesetzten cDNA-Mengen in die PCR-Reaktion wurde zusätzlich zu den beiden SEC61 α -Genen das in Zellen konstitutiv exprimierte HPRT-Gen (kodierend für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) per PCR amplifiziert. Gezeigt sind die Ergebnisse der Untersuchung an den Mausorganen und für die Maus-Embryonalstadien.

Es zeigte sich, daß SEC61 α -II in allen Proben neben SEC61 α -I nachweisbar war. Schließt man von der Bandenstärke in der RT-PCR auf das Expressionsniveau der Gene in den Zellen, so wird im Vergleich der verschiedenen Mausorgane SEC61 α -I in allen Organen etwa gleich stark exprimiert, während das Expressionsniveau von SEC61 α -II sich zwischen den Organen unterscheidet: In der Hirnprobe liegt demnach relativ viel SEC61 α -II-RNA vor, in Herz und Niere etwas weniger, in Leber und Milz von den getesteten Organen am wenigsten (Abb. 7, Bahnen 1 bis 6).

Da sich Organe aus sehr heterogenen Zellverbänden zusammensetzen können, besteht die Möglichkeit, daß einzelne Zellen/Zellarten ein völlig anderes Verhältnis der Expressionshöhe

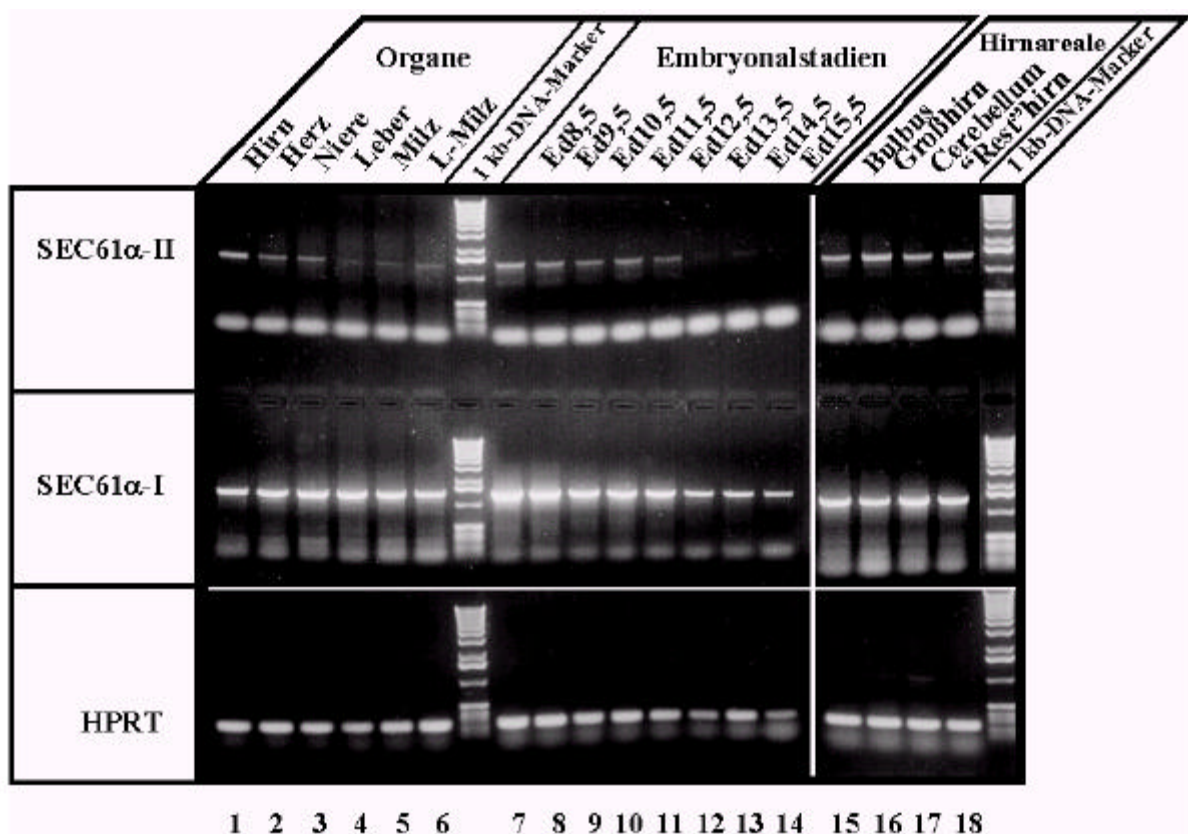


Abbildung 7. Expression der beiden SEC61 α -Gene in diversen Geweben der Maus. Für die Untersuchung der Expression der beiden Gene wurde Gesamt-RNA verschiedener Organe sowie PolyA⁺-RNA aus 8 Embryonalstadien revers transkribiert und die resultierende cDNA mit typ- und speziesspezifischen Oligonukleotiden für die beiden SEC61 α -Gene per PCR amplifiziert. Für die Amplifikation des SEC61 α -I-Gens wurde das Primerpaar 1181/757, für die des SEC61 α -II-Gens das Primerpaar 1182/758 eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide führten zur Amplifikation nahezu des gesamten kodierenden Bereiches (1350 bp) der beiden Gene. Zum Vergleich der eingesetzten Mengen an RNA bzw. cDNA in den einzelnen Ansätzen wurde als Kontrolle ein 246 bp-Fragment des konstitutiv exprimierten HPRT-Gens amplifiziert (mit dem Primerpaar 825/824). L-Milz, Milz aus einer an einem Lymphom erkrankten Maus; Ed8,5, Embryonaltag 8,5 usw.. Als DNA-Größenmarker wurde der 1kb-DNA-Marker der Fa. Gibco verwendet. Die Sequenzen der hier verwendeten Primer sowie der für andere RT-PCR-Experimente eingesetzten Primer findet sich in Abschnitt 5.2.5.

beider Gene aufweisen als das Organ als Ganzes, oder daß sie sogar im Extremfall nur die ein oder andere Variante des SEC61 α -Gens exprimieren. Dies wurde in erster Näherung getestet, indem Zellen aus einzelnen Hirnarealen, dem Bulbus, Teilen des Großhirns, dem Cerebellum und dem „Rest“hirn, untersucht wurden. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht nennenswert von denen für das Gesamtorgan, bestätigen jedoch die relativ starke Expression des SEC61 α -II-Gens in Hirngewebe im Vergleich zu den übrigen Organen (Abb. 7, Bahnen 1 und 15 bis 18 versus Bahnen 2 bis 6). Die getesteten Primärkulturen und Zelllinien, die z.T. monoclonal, zumindest aber oligoclonal sind, zeigten ebenfalls keine Abweichung von den Ergebnissen aus den Mausorganen: In allen wurde SEC61 α -II neben SEC61 α -I exprimiert (nicht gezeigt). Auch die untersuchten Embryonalstadien wiesen keinerlei auffällige Expressionscharakteristika der beiden SEC61 α -Gene auf. Die Stärke der Expression nahm für beide Gene (sowie für HPRT) kontinuierlich von Tag 8,5 nach Tag 15,5 ab (Abb. 7, Bahnen 7 bis 14).

Auffällig an den RT-PCR-Produkten für SEC61 α -II war, daß sich bei jeder Primerkombination zusätzlich zu dem Hauptprodukt in voller Länge noch verkürzte Nebenbanden ergaben. Sequenzierung dieser Banden zeigte, daß es sich um Fragmente mit fehlenden Exons handelt, wie sie auch beim „Screening“ der cDNA-Banken gefunden wurden, dort allerdings ausschließlich, so daß vor Durchführung der RT-PCR-Experimente nicht klar war, ob ein Volle-Länge-Transkript des SEC61 α -II-Gens überhaupt in den Zellen gebildet wird. Gemäß der Bandenstärke der PCR-Produkte scheint dies jedoch überwiegend der Fall zu sein, auch wenn immer ein deutlicher Anteil der verkürzten Produkte nachweisbar war. Welche Bedeutung diese unvollständigen Moleküle haben, ob es sich einfach um falsch gespleißte oder aber um alternativ gespleißte, funktionelle Varianten des Sec61 α -II-Moleküls handelt, ist bislang unklar. Immerhin war dieses Phänomen in allen untersuchten Spezies zu beobachten, unabhängig davon, ob RNA aus Organen, Primär- oder Zellkulturen untersucht wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente weitere Hinweise darauf geben, daß das SEC61 α -II-Gen in Säugerzellen funktionell exprimiert wird. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die auf RNA-Ebene nachgewiesenen Transkripte in voller Länge auch zu funktionellen Proteinen translatiert werden. Im Unterschied zum SEC61 α -I-Gen zeigten sich in den untersuchten Zellen und Geweben starke Unterschiede in der Expressionshöhe des SEC61 α -II-Gens, zudem wies das Auftreten verkürzter PCR-Produkte darauf hin, daß ein Teil der SEC61 α -II-Transkripte unvollständig vorliegt. Deren mögliche Bedeutung ist bislang vollkommen unklar.

Für zukünftige Untersuchungen wird es essentiell sein, eine Nachweismethode auf Proteinebene zu etablieren. Zur Gewinnung eines peptidspezifischen Antikörpers gegen den äußersten C-Terminus des Sec61 α -II-Proteins wurden daher Kaninchen mit dem Peptid Cys-KEQAEVGGMGALFF-NH₂ immunisiert. Die vollständige Charakterisierung des affinitätsgereinigten Antiserums insbesondere im Hinblick auf mögliche Kreuzreaktivität mit dem Peptidantikörper gegen den C-Terminus des Sec61 α -I-Proteins (KEQSEVGSMSGALLF) ist bislang noch nicht abgeschlossen. Jedoch geben die ersten Untersuchungen Hinweise darauf, daß das Antiserum gegen den C-Terminus des Sec61 α -II-Proteins zwar ein Protein der erwarteten Größe erkennt, aber nicht mit dem Sec61 α -I-Protein kreuzreagiert (A. Wittstruck und E. Hartmann, persönliche Mitteilung). Sollte umgekehrt ebenfalls keine Kreuzreaktivität des Antiserums gegen den C-Terminus der Sec61 α -I-Proteins mit dem Sec61 α -II-Protein bestehen (was zu zeigen bleibt), so ständen zwei spezifische Peptidantikörper für weitere Analysen der beiden Sec61 α -Proteine in Säugerzellen zur Verfügung.

3.2. SEC61-Paraloge in der Hefe *S. cerevisiae*

3.2.1. Das Ssh1-Protein

Auch in der Hefe *S. cerevisiae* finden sich paraloge SEC61-Gene und -Proteine. Ein dem SEC61 nahe verwandtes Gen wurde 1993 von E. Hartmann und S. Prehn entdeckt und mit SSH1 (Sec sixty-one homolog 1) bezeichnet (GenBank Acc.No. U05336). Im Rahmen des *S. cerevisiae*-Sequenzierungsprojektes wurde dieses Gen bei der Sequenzierung des Hefe-Chromosoms II auch von anderen als SEC61-homologes Gen identifiziert (Feldmann et al., 1994). Abweichend von der Situation in Säugerzellen unterscheiden sich die paraloge Proteine in der Hefe deutlich voneinander. Das Protein Ssh1p weist etwa 30% identische Aminosäuren sowohl im Vergleich zu Sec61p aus Hefe als auch zu Sec61 α aus Säugerzellen auf (vgl. Tab. 4). Somit ist der Grad der Identität zwischen dem Säuger Sec61 α und Sec61p mit 55% stärker als zwischen Ssh1p und Sec61p. Wie für die bereits bekannten Sec61-Proteine ergibt die Computeranalyse der Sequenz des Ssh1-Proteins ebenfalls 10 hydrophobe Segmente, über die das Protein in der Membran verankert sein könnte. Abbildung 8 zeigt den Vergleich der beiden Hefeproteine Ssh1p und Sec61p miteinander sowie jedes der beiden Proteine mit dem Säuger Sec61 α -I-Protein. Zytoplasmatische und luminal Bereiche sowie die membrandurchspannenden hydrophoben Segmente sind farblich gekennzeichnet. Interessanterweise zeigen die vorhergesagten zytoplasmatischen Bereiche im Vergleich zwischen Sec61p und Ssh1p eine Identität von etwa 45%, oft in Gruppen von 5-7 Aminosäuren, während die Transmembransegmente und die luminalen Bereiche mit jeweils etwa 27% Identität erheblich weniger Ähnlichkeit aufweisen. Dies deutet auf gemeinsame

Proteine im Vergleich	Grad der Identität (in %)			
	Zyt.	Lum.	TM	gesamt
Sec61p/Ssh1p	45	27	27	32
Sec61p/Sec61ap	47	54	61	55
Ssh1p/Sec61ap	38	21	28	29

Tabelle 4. Konservierung der Sec61-Proteine aus Hefe und Säugerzellen bezüglich ihrer gemäß der putativen Membrananker vorhergesagten subzellulären Lokalisation. Zyt., zytoplasmatische Bereiche; Lum., luminal Bereiche; TM, Transmembranbereiche.

Bindungspartner im Zytoplasma hin. Die Konservierung des Sec61p aus Hefe und des Sec61 α aus Säugerzellen ist mit 47% im zytoplasmatischen Bereich etwa genauso stark wie die der beiden Hefeproteine. Im Unterschied zu diesen liegt jedoch für Sec61p und Sec61 α der Grad der Identität in den Transmembransegmenten und den luminalen Bereichen noch weit höher als in den zytoplasmatischen Bereichen der Proteine (Tabelle 4).

Mit dem Ssh1p findet sich in *S. cerevisiae* somit ein zum Sec61p paraloges, jedoch von diesem deutlich verschiedenes Protein. Dieses soll in den folgenden Abschnitten, jeweils im direkten Vergleich mit Sec61p, bezüglich seiner Lokalisation, möglicher Funktionen und Interaktionspartner umfassend charakterisiert werden.

3.2.1.1. Lokalisierung des Ssh1p in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums

Es stellte sich zunächst die Frage, ob das dem Sec61p strukturell sehr ähnliche Protein Ssh1p wie dieses in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und somit möglicherweise ebenfalls für den Proteintransport durch diese Membran eine Rolle spielt.

Ssh1p	MSGFRLIDIVKPILPILPEVELPFEEKLPFDDK	IVYTIFAGLIYLF-AQFPLVGLPKATTPN	60
Sec61p	MS R D KP LPEV P K P K T LI L Q PL G	MSSNRVLDLFPFESFLPEVIAPERKVYPYNQKLIWTGVSLLI FLILGQIPLYGI--VSSE	58
Ssh1p	VNDPIYFLRGVFGCEPRTLLE	FGLFPNISSGLILQLLAGLKVIKVNFKIQSDRELFQSLTK	121
Sec61p	DP Y LR TLLE G P I S I Q L G	TSDPLYWLRAMLASNRGTLLLEGVSPITSSMIFQFLQGTQLLQIRPESKQDRELFQIAQK	119
Ssh1p	VFAIVQYVILTNI FIFAGYFGD--DLSVVQIGLINFQLVGAGIFTLLAEVIDKGFGFSSG	V AI G G DL L FQL A LL E KG G SG	180
Sec61p	VCAIILILGQALVVVMTGNYGAPSDLG LPICLLLIFQLMFASLIVMLLDELLSKGYGLGSG		180
Ssh1p	AMIINTVVIATNLVA	DTFGVSQIKVGEDDQTEAQGALINLIQGLRSKHKTFIGGIISAFNR	241
Sec61p	IA F G E GA I L K AF R	ISLFTATNIAEQIFWRAFAPTTVNSGRG--KEFEGAVIAFFH-LLAVRKDKKRALVEAFYR	238
Ssh1p	DYLPNLT TTTIIVLAIAIIVCYLQSVRVELPIRSTRARGTNNVYPIKLLYTGCLSVLFSYTI	LPN AI V YLQ R ELPIRST RG YPIKL YT	302
Sec61p	TNLPNMFQVLMTVAIFLFLVLYLQGFYELPIRSTKVRGQIGIYPIKLFTYSNTPIMLQSAL		299
Ssh1p	LFYIHIFAFVLIQLVAKNEPHTHIICKIMGHYENANLLAVPTFPLSLLA--PPTSFFKGV	I F Q PT G P LS LA P	360
Sec61p	TSNI----FLISQILFQKYPTNPLIRLIGVWG-IRPGTQGPQMALSGLAYYIQPLMSLSEA		355
Ssh1p	TQQPLTFITYSAFILVTGIWFADKWQAISGSSARDVALEFKDQGITLMGRREQNVAKELNK	P I Y F L F W ISG S RD A FKDQG G RE EL K	421
Sec61p	LLDPIKTIVYITFVLGSCAVFSKTWIEISGTSPRDIKQFKDQGMVINGKRETSIYRELKK		416
Ssh1p	VIPIAAVTGASVLSLITVIGESLGLKGKAAGIVVGIAGGFSLLEVITIEYQQSGGQSALNQ	IP AA G V LG G A I E E G N	482
Sec61p	IIP TAAAFGGATIGALSVGSDLLGTLGSGASILMATTTIYGYYEAAAKE-----GGFTKNL		472
Ssh1p	VLGVPGAM	490	
Sec61p	V G M VPGFSDLM	480	

Abbildung 8. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ssh1p und Sec61p aus *S. cerevisiae*. Entsprechend ihrer Lokalisation sind die Proteinabschnitte farblich abgesetzt: rotgedruckte, unterstrichene Sequenzabschnitte markieren die Position der putativen Membrananker, in schwarzer Schrift erscheinen die zytoplasmatischen, in blauer Schrift die luminalen Proteinsegmente. Punkte über bzw. unter den Sequenzen markieren Positionen mit identischen Aminosäureresten im Vergleich zum Säuger SEC61 α -I-Protein. Membrananker für Ssh1p kalkuliert mit MEMSAT.

Alternativ war denkbar, daß Ssh1p an Transportvorgängen in andere Zellkompartimente als das ER beteiligt sein könnte. Die Lokalisation des Proteins wurde durch Immunfluoreszenz untersucht. Es zeigte sich, daß zwei im Rahmen dieser Arbeit gegen das Ssh1-Protein hergestellte, peptidspezifische Antikörper zum einen gegen den N-Terminus, zum anderen gegen den C-Terminus des Proteins (vgl. auch 3.2.3.1.) für diese Untersuchung nicht geeignet waren. Deshalb wurde eine markierte Version des Ssh1-Proteins konstruiert, bei der das Protein ein c-Myc-Epitop an seinem C-Terminus trägt (Ssh1^{Myc}). Die Expression des Gens für dieses markierte Protein in Hefezellen geschah mit Hilfe eines ARS/CEN Vektors unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors. Antikörper gegen das c-Myc-Epitop wurden für die

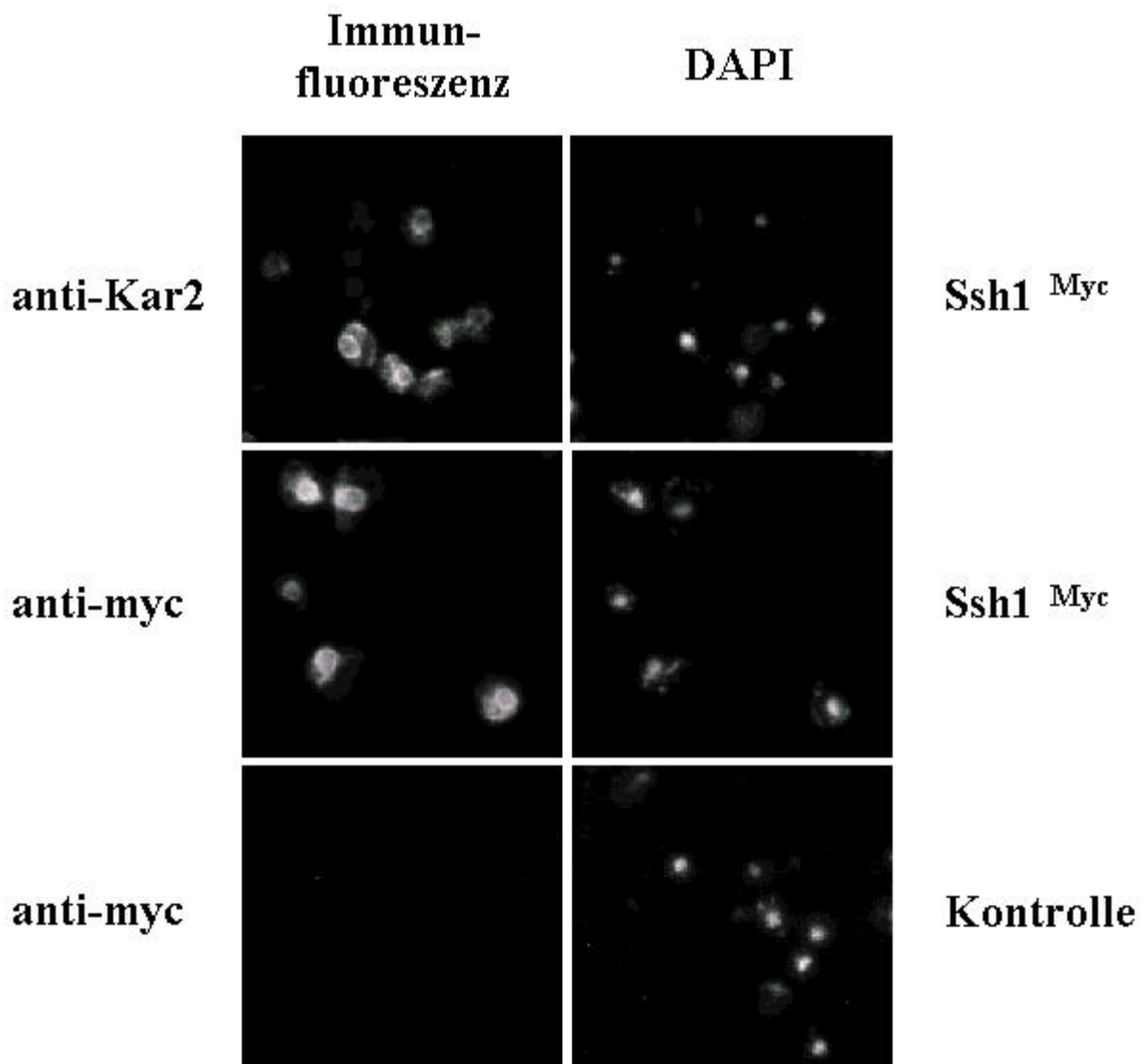


Abbildung 9. Lokalisierung des Ssh1p in der ER-Membran. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde anhand von haploiden Zellen durchgeführt, die entweder die Myc-markierte Version des Ssh1-Proteins, Ssh1^{Myc}, exprimiert von dem Plasmid pKF15, trugen (die zwei oberen Reihen) oder anhand von Zellen, die den Kontrollvektor pRS414 trugen (untere Reihe). Als Kontrolle für die spezifische Anfärbung der ER-Membran (obere Reihe) wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das luminale ER-Protein Kar2p inkubiert. Die Zellen der unteren beiden Reihen wurden mit 9E10 Antikörpern spezifisch für das c-Myc-Epitop inkubiert. Zusätzlich wurden alle Proben mit DAPI gefärbt, um die Position der Kerne anzuzeigen (rechte vertikale Reihe).

Lokalisierung des Ssh1Myc-Proteins in den Zellen durch Immunfluoreszenz eingesetzt. Diese Antikörper wurden aus dem Überstand der Hybridomzelllinie GE10 gewonnen und über eine Protein G-Sepharose-Säule gereinigt.

Wie Abbildung 9 zeigt, unterscheidet sich das Färbemuster nicht von dem des luminalen ER-Proteins Kar2p, das als Referenzprotein verwendet wurde. Angefärbt wird im wesentlichen eine ringförmige perinukleäre Region. Zum Vergleich ist eine Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) gezeigt. Kontrollzellen, die Ssh1^{Myc} nicht exprimieren, werden durch den c-Myc spezifischen Antikörper nicht angefärbt. Somit ist Ssh1p offenbar ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert.

3.2.1.2. Deletion des SSH1-Gens

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob das SSH1-Gen ebenso wie sein Paraloges, das SEC61-Gen, für die Hefezelle essentiell ist. Dazu wurde eine Mutante erzeugt, in welcher der überwiegende Teil der kodierenden Region des SSH1-Gens entfernt und durch ein Fragment, das das LEU2-Gen als Selektionsmarker enthält, ersetzt wurde (Δ ssh1::LEU2). Die Deletion wurde durch Southern Blot überprüft (nicht gezeigt). Aus Abbildung 10 geht hervor, daß die Deletion des SSH1-Gens nicht letal ist. Jedoch wachsen die Mutanten mit einer Verdopplungszeit von 125-130 min langsamer als die Wildtyp (wt)-Zellen, deren Zahl sich in 90 min verdoppelt. Besonders deutlich wird das verlangsamte Wachstum des Δ ssh1-Stammes beim Vergleich der Koloniegröße auf Agarplatten. Die Kolonien des Deletionsstammes sind bei Wachstum auf Vollmedium wesentlich kleiner als die des wt-Stammes (vgl. dazu Abb. 15A).

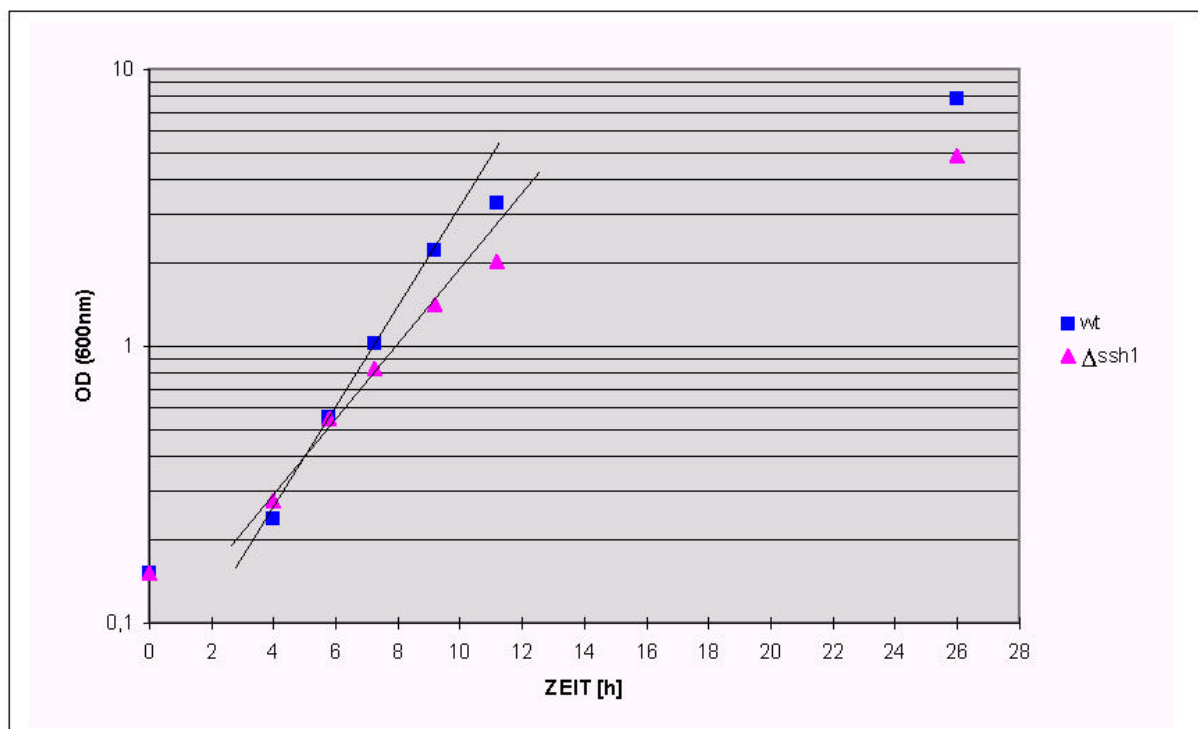


Abbildung 10. Wachstumsphänotyp der SSH1-Deletionsmutante. Zellen eines wt-Stammes und einer Δ ssh1-Mutante wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens bei 30°C in Vollmedium getestet. Dargestellt ist die Absorption (Optische Dichte) der Kulturen bei 600 nm (OD_{600nm}), halblogarithmisch aufgetragen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Verdopplungszeit wurde aus der Steigung der Geraden während der Phase des exponentiellen Wachstums ermittelt.

3.2.1.3. Genetische Interaktion zwischen SSH1 und SEC61

Wie der vorangegangene Abschnitt zeigt, besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen Ssh1p und Sec61p darin, daß Ssh1p im Gegensatz zu Sec61p für die Hefezelle nicht essentiell ist. Immerhin wäre aufgrund der gleichen Lokalisation beider Proteine und ihrer ähnlichen Struktur denkbar, daß sie vergleichbare Funktionen ausüben. Es stellte sich daher die Frage, ob zwischen SEC61 und SSH1 genetische Interaktionen bestehen. Dazu wurde ein $\Delta ssh1::ADE2$ Deletionskonstrukt in einen Stamm eingeführt, der ein temperatur-sensitives (ts-) Allel des SEC61-Gens trägt (*sec61-2*; Deshaies und Schekman, 1987). Die Kombination beider Mutationen in der resultierenden Doppelmutante *sec61-2* $\Delta ssh1$ zeigte in der Tat einen synthetisch letalen Phänotyp: Bei 36°C wachsen Zellen der *sec61-2*-Mutante noch weitestgehend normal, der ts-Phänotyp zeigt sich erst bei über 37°C, die Zellen der Doppelmutante waren in ihrem Wachstum jedoch schon bei 36°C erheblich beeinträchtigt (Abbildung 11). Daraus läßt sich ableiten, daß Ssh1p und Sec61p zumindest teilweise überlappende Funktionen besitzen müssen.

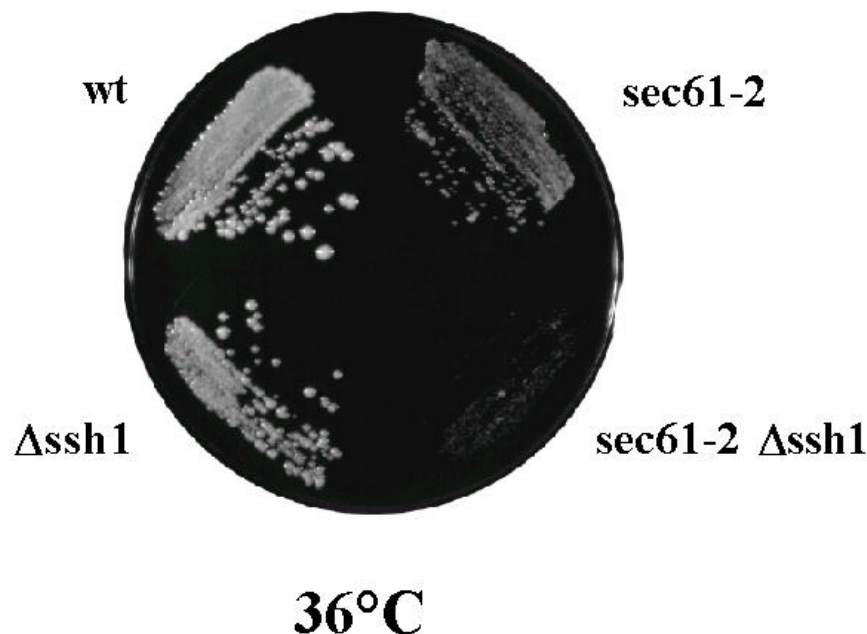


Abbildung 11. Genetische Interaktion zwischen SEC61 und SSH1. Zellen eines wt-Stammes, einer ts-Mutante bezüglich SEC61 (*sec61-2*), einer SSH1-Deletionsmutante ($\Delta ssh1$) sowie einer Doppelmutante (*sec61-2* $\Delta ssh1$) wurden auf Wachstum bei 36°C auf Platten mit Vollmedium getestet.

3.2.1.4. Einfluß der SSH1-Deletion auf die Akkumulation von Präkursoren

Wenn Ssh1p eine Funktion beim Proteintransport durch die ER-Membran innehat, wie es durch die genetische Interaktion zwischen SSH1 und SEC61 nahegelegt wird, so sollte es in der Deletionsmutante $\Delta ssh1$ möglicherweise zu einer Akkumulation unprozessierter Präkursorproteine kommen. Um dies zu prüfen, wurden nach einer Puls-Markierung mit [³⁵S]-Methionin Hefezellextrakte hergestellt, die für Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen

das sekretorische Protein α -Faktor oder das luminale Protein Kar2p verwendet wurden. Als Positivkontrolle wurde die temperatur-sensitive Mutante *sec61-2*, als Negativkontrolle ein wt-Stamm eingesetzt. Für beide untersuchten Proteine zeigte die Δ ssh1-Mutante keinen Unterschied zum wt-Stamm, d.h. es konnte im Gegensatz zur *sec61-2*-Mutante keine Akkumulation von unprozessierten Präkursoren nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um auszuschließen, daß dieses Ergebnis auf einer Adaptation der Zelle an das Fehlen des Ssh1-Proteins beruht, wurde untersucht, ob der direkte Entzug des Proteins zu Präkursorakkumulation führen würde. Dazu wurde in den *ssh1*-Deletionsstamm ein ARS/CEN-Plasmid eingebracht, welches das SSH1-Gen unter Kontrolle des induzierbaren GAL10-Promotors trägt (pTX88). In Galaktose-haltigem Medium ist das Expressionsniveau an Ssh1p in diesen Zellen mit dem in wt-Zellen vergleichbar (Abbildung 12, Bahn 2 versus 5). Austausch der Kohlenstoffquelle von Galaktose gegen Glucose führt zum Abschalten des GAL10-Promotors. Diese Abschaltung ist allerdings nicht absolut vollständig, d.h. eine geringe Restexpression von etwa 1-5% des Ausgangsniveaus bleibt erhalten und ist nach 8-10 h erreicht (Bahn 4).

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abschaltung des Promotors wurde eine Puls-Markierung der Zellen mit [35 S]-Methionin durchgeführt. Die anschließend präparierten Zellextrakte wurden für Immunpräzipitationen mit den oben genannten Antikörpern eingesetzt. Um ein weiteres Transportsubstrat zu testen, wurden zusätzlich Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Invertase durchgeführt. Das Invertase-Gen wird allerdings bei Vorhandensein von Glucose als Kohlenstoffquelle von den Zellen nicht exprimiert. Daher wurden für diese dritte Immunpräzipitation Zellextrakte aus Zellen gewonnen, die etwa 20-25 min vor der Puls-Markierung in Medium mit nur 0,1% Glucose inkubiert wurden, um eine Derepression des Invertase-Gens zu bewirken.

Als Positivkontrolle wurde wieder die *sec61-2*-Mutante verwendet, als Negativkontrolle ein wt-Stamm, der wie der zu untersuchende Stamm von Galaktose auf Glucose umgesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach diesem Wechsel untersucht wurde.

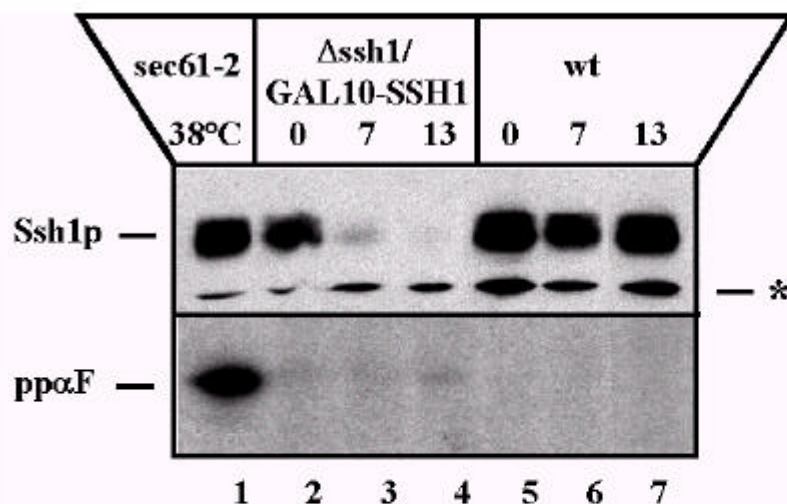


Abbildung 12. Untersuchung auf Akkumulation von Präkursorproteinen nach Entzug des Ssh1-Proteins. Mutante Zellen, die das SSH1-Gen unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors trugen, und Zellen eines wt-Stammes wurden 0, 7 und 13 h nach Austausch der Kohlenstoffquelle von Galaktose durch Glucose auf ihren Gehalt an Ssh1-Protein hin untersucht. Dies geschah durch Immunoblotting von Membranpräparationen (entsprechend 1 OD_{600nm}) der Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt.

Für die Untersuchung auf Präkursorakkumulation wurden die Zellen für 10 min mit [35 S]-Methionin markiert, anschließend wurden Zellextrakte präpariert, die für die Immunpräzipitation mit dem Antikörper gegen den α -Faktor eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle wurden Zellen des temperatur-sensitiven *sec61-2*-Stammes verwendet, die für 2 h bei der nicht-permissiven Temperatur (38°C) inkubiert wurden, bevor sie für die Immunpräzipitation radioaktiv markiert wurden. Die gefällten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. ppαF bezeichnet den akkumulierten Präpro- α -Faktor, der Stern markiert unspezifische Banden, die durch die Ssh1p-Antikörper erkannt werden.

In diesem Experiment nach direktem Entzug des Ssh1-Proteins konnte keine Präkursorakkumulation für zwei der drei untersuchten Proteine, nämlich Kar2p und Invertase, festgestellt werden (nicht gezeigt). Lediglich für den Präpro- α -Faktor (pp α F) wurde 13 h nach Abschalten des Gal10-Promotors eine sehr schwache Bande (Abb. 12, Bahn 4) detektiert. Der Vergleich mit der Positivkontrolle (Bahn 1) zeigt jedoch, daß selbst hier kaum von einer nennenswerten Präkursorakkumulation gesprochen werden kann.

Das Ergebnis der Untersuchung kann eine Beteiligung des Ssh1p an der Proteintranslokation durch die ER-Membran nicht nachweisen, schließt sie jedoch auch nicht aus. Da für alle drei getesteten Substrate bekannt ist, daß sie Sec61p-abhängig transportiert werden, ist ein starker Akkumulationseffekt nach Deletion des SSH1-Gens ohnehin nicht zu erwarten. Vorstellbar wären allerdings indirekte Effekte, verursacht dadurch, daß Proteine, die normalerweise Ssh1p für ihre Translokation benötigen, auf den vom Präpro- α -Faktor benutzten Weg der Sec61p-vermittelten Translokation ausweichen müssen. Die marginale Beeinträchtigung der Translokation des Präpro- α -Faktors infolge des Ssh1p-Entzugs könnte so verstanden werden.

3.2.2. Paralogie beta-Untereinheiten

Im Zuge der weiteren Charakterisierung des Ssh1p und seiner Funktion wurde untersucht, ob es - vergleichbar dem Sec61p - in der ER-Membran mit weiteren Proteinen assoziiert vorliegt. In diesem Zusammenhang wurde zunächst geprüft, ob möglicherweise ebenfalls paraloge Gene und Proteine der beta- und gamma-Untereinheit des trimeren Sec61p-Komplexes existieren. In der Tat konnte auch für das Gen der β -Untereinheit des Sec61p-Komplexes, SBH1, in der Datenbank ein paraloges Gen gefunden werden, das mit SBH2 (Sec61 **beta** homolog 2) bezeichnet wurde. Beide Gene sind auf Chromosom V des *S. cerevisiae* Genoms lokalisiert (GenBank Acc. No. SCE9747 und SCE9537). SBH2 kodiert für ein Protein von 9,6 kD, das zum Sbh1p zu 52% identisch ist (Abb. 13). Die Identität zwischen Sbh2p und Sec61 β im Säuger liegt mit 23% etwas niedriger als die zwischen Sbh1p und Sec61 β (30%). Wie die beiden anderen β -Untereinheiten durchspannt auch Sbh2p die Membran vermutlich einmal mit einem C-terminal gelegenen hydrophoben Segment, wobei der Aminoterminus auf der zytoplasmatischen Seite gelegen ist.

Sbh2p	MAASVPPGGQ-----RILQKRRQAQSIKEKQAKQTPSTSTRQAGYGG ::: . ::: : : ... :	41
Sbh1p	MSSPTPPGGQ-----RTLQKRKQGSS--QKVAASAPKKNNTN----- :: :: .:: :::: . : : . .:::	34
Sec61β	MPGPTPSGTVNGSSGRSPSKAVAARAAGSTVRQRKNASCGRTRSAGRTTSA	50
Sbh2p	SSSSILKLYTDEANGFRVDSLVLFLSVGFIFSVIALHLLTKFT-HII :: ::: .:: : : : : : : ::	88
Sbh1p	SNNSILKIYSDEATGLRVDPLVVLFLAVGFIFSVVALHVISKVAGKLF :..:: :: :::. ::: : :::: ::: : .	82
Sec61β	GTGGMWRFYTEDSPGLKVGPPVVLVMSLLFIASVFMLHIWNGKYTRS--	96

Abbildung 13. Vergleich der Aminosäuresequenzen der beta-Untereinheiten aus *S. cerevisiae*, Sbh1p (Panzner et al., 1995) und Sbh2p (diese Arbeit) sowie Sec61 β aus *Canis familiaris* (Hartmann et al., 1994). Vertikale Linien zwischen den Sequenzen bezeichnen identische Aminosäurereste, Doppelpunkte und Punkte zeigen starke bzw. schwache Ähnlichkeiten. Die unterstrichenen Sequenzen markieren die Position der putativen Membrananker.

3.2.2.1. Deletion der SBH-Gene

Um zu untersuchen, ob ähnlich wie bei dem paralogen Paar Sec61p/Ssh1p auch bei den beiden beta- Untereinheiten nur eines der Proteine für das Wachstum der Hefezelle essentiell ist, wurden Deletionskonstrukte beider Gene hergestellt und zunächst jeweils einzeln in diploide wt-Stämme eingeführt. Der größte Teil der kodierenden Region des SBH1-Gens war durch das HIS3-Gen ($\Delta sbh1::HIS3$), der des SBH2-Gens durch das ADE2-Gen ($\Delta sbh2::ADE2$) ersetzt worden. Nach Sporulation dieser diploiden Stämme wurden Tetradenanalysen durchgeführt, die für beide Mutanten in allen Fällen vier lebensfähige Sporen ergaben. Sowohl die $\Delta sbh1$ -Mutanten als auch die $\Delta sbh2$ -Mutanten wuchsen bei allen getesteten Temperaturen auf festem Medium (Abbildung 14) sowie in Flüssigkultur (nicht gezeigt) wie der wt-Stamm. Dies war insbesondere für die $\Delta sbh1$ -Mutante sehr unerwartet, da somit Sbh1p als einzige Komponente des trimeren Sec61p-Komplexes nicht essentiell für das Wachstum der Hefezelle ist. Um die Möglichkeit zu testen, daß die Deletion des SBH1-Gens zumindest teilweise von Sbh2p kompensiert werden kann, wurde eine Doppelmutante untersucht, in der beide Gene, SBH1 und SBH2, deletiert waren. Auch diese war lebensfähig, zeigte aber einen starken temperatur-sensitiven Wachstumsphänotyp: Die Zellen wuchsen wie wt-Zellen bei 30°C, jedoch nur sehr eingeschränkt bei 37°C (Abbildung 14).

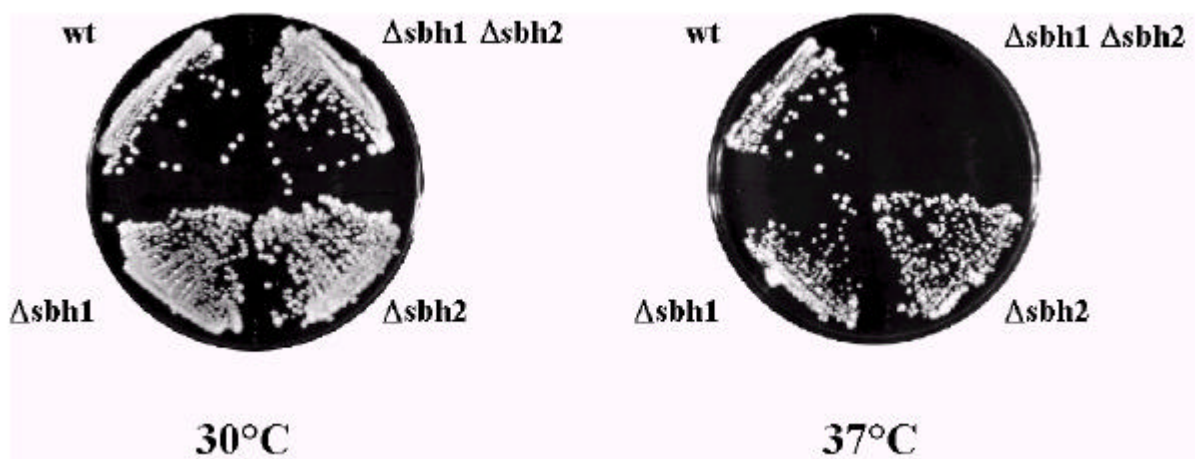


Abbildung 14. Test der Deletionsmutanten von Sbh1p und Sbh2p auf Wachstumsdefekte. Das Wachstum von Zellen eines wt-Stammes und der Deletionsmutanten $\Delta sbh1$ und $\Delta sbh2$ sowie der Doppelmutante $\Delta sbh1 \Delta sbh2$ wurde bei 30°C und 37°C auf Agarplatten mit Vollmedium getestet.

Die Analyse der Deletionsstämme wurde auf zwei weitere Doppeldeletionsmutanten ausgedehnt: $\Delta ssh1 \Delta sbh1$ sowie $\Delta ssh1 \Delta sbh2$ zeigten keinen temperaturabhängigen Wachstumsdefekt (nicht gezeigt), sondern lediglich den der $\Delta ssh1$ -Mutante (Abbildung 15A). Die Tabelle in Abbildung 15B zeigt zusammenfassend die Wachstumsraten diverser Deletionsmutanten bei 30°C in Flüssigkultur. Für den wt-Stamm sowie die sbh1- und sbh2-Einzel- und Doppeldeletionsmutanten ergeben sich Verdopplungszeiten von etwa 1,5 h, während die Deletion des SSH1-Gens, entweder allein oder in Kombination mit einer der beiden beta-Untereinheiten, eine Verlängerung der Verdopplungszeit auf etwa 2 h bewirkt.

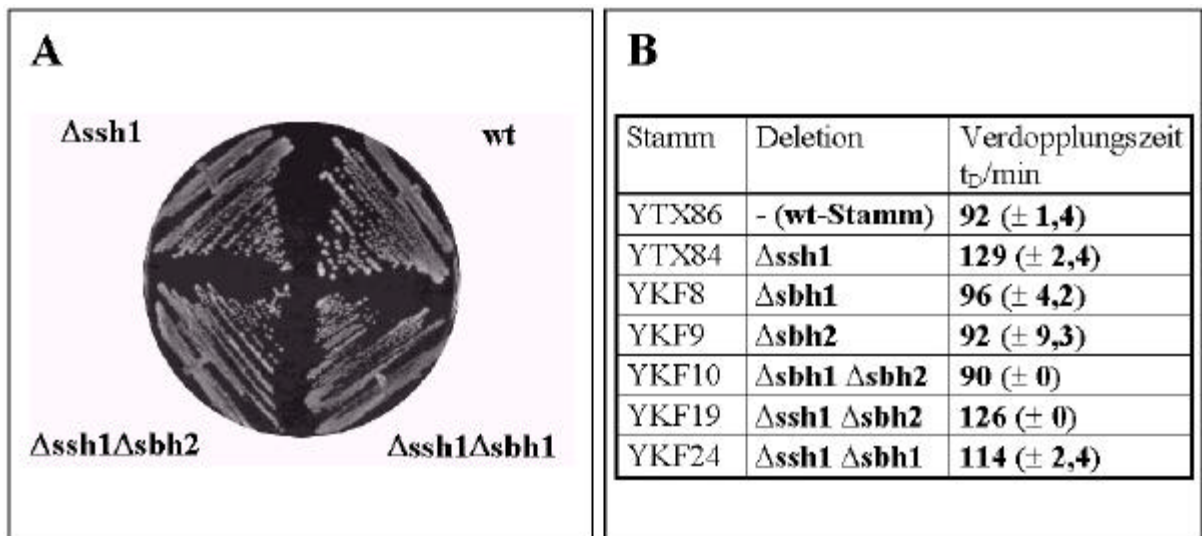


Abbildung 15. (A) Das Wachstum von Zellen eines wt-Stammes sowie der Mutanten $\Delta ssh1$, $\Delta ssh1 \Delta sbh2$ und $\Delta ssh1 \Delta sbh1$ wurde bei 30°C auf Agarplatten mit Vollmedium getestet. (B) Verdopplungszeiten diverser Mutanten bei Wachstum in Vollmedium bei 30°C in Flüssigkultur. Zellen eines wt-Stammes sowie diverser Deletionsmutanten wurden aus über Nacht gewachsenen Vorkulturen in Vollmedium mit einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0,15 angeimpft und bei 30°C schüttelnd inkubiert. Pro Stamm wurden jeweils drei Kulturen parallel untersucht. Im Untersuchungszeitraum von 12 h wurden zur Bestimmung der optischen Dichte der Kulturflüssigkeit bei 600 nm Proben im Abstand von etwa 1,5 h entnommen. Die Ermittlung der Verdopplungszeit erfolgte nach halblogarithmischer Auftragung der OD_{600nm} in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die oben angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar (in Klammern die Standardabweichung). Die Ergebnisse dieses Experiments stehen repräsentativ für zahlreiche andere Untersuchungen.

3.2.2.2. Beteiligung von *Sbh1p* und *Sbh2p* an der Proteintranslokation

Da die mögliche Rolle der paralogen Proteine *Sbh1p* und *Sbh2p* bei der Proteintranslokation zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung dieser Arbeit nicht untersucht war, wurden die Deletionsmutanten $\Delta sbh1$ und $\Delta sbh2$ sowie die Doppelmutante sowohl bei 30°C als auch bei 38°C auf Akkumulation von Präkursorformen der Proteine α -Faktor und Kar2 untersucht wie in Abschnitt 3.2.1.4. für die $\Delta ssh1$ -Mutante beschrieben. Als Kontrolle wurde wiederum die *ts*-Mutante *sec61-2* verwendet. Die Ergebnisse unterschieden sich für beide Temperaturen nicht, wie in Abbildung 16 exemplarisch für 38°C dargestellt ist: Akkumulation der unprozessierten Präkursorform von Kar2p konnte nicht für die Einzelmутanten $\Delta sbh1$ (Abb. 16, Bahn 2) oder $\Delta sbh2$ (Bahn 3), jedoch für die Doppelmutante $\Delta sbh1 \Delta sbh2$ (Bahn 4) nachgewiesen werden, wenn auch nicht so stark wie in der *sec61-2*-Mutante (Bahn 5). Im Falle des α -Faktors konnte so gut wie kein Protein aus wt-Zellen (Bahn 1) immunpräzipitiert werden, da die Präkursorform des α -Faktors (Präpro- α -Faktor, pp α F) sehr schnell prozessiert und transportiert wird. Wie schon zuvor bei Kar2p, ist auch für den pp α F eine Akkumulation in der Doppelmutante (Bahn 4) zu beobachten, hier ebenfalls nicht so stark wie in der *sec61-2*-Mutante (Bahn 5). Interessanterweise zeigt auch die Einzelmутante $\Delta sbh1$ eine gewisse Akkumulation des pp α F, im Gegensatz zu der Mutante $\Delta sbh2$ (Bahn 3 versus Bahn 2). Die Deletionsmutanten wurden ebenfalls auf Defekte in der posttranslationalen Proteintranslokation *in vitro* untersucht (K. Plath, nicht gezeigt). Dazu wurden Mikrosomen aus wt-Zellen und aus den Deletionsmutanten (bei 30°C gewachsen) isoliert und auf die

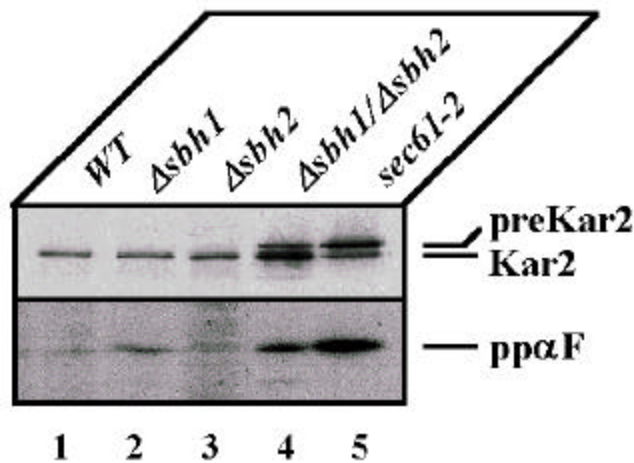


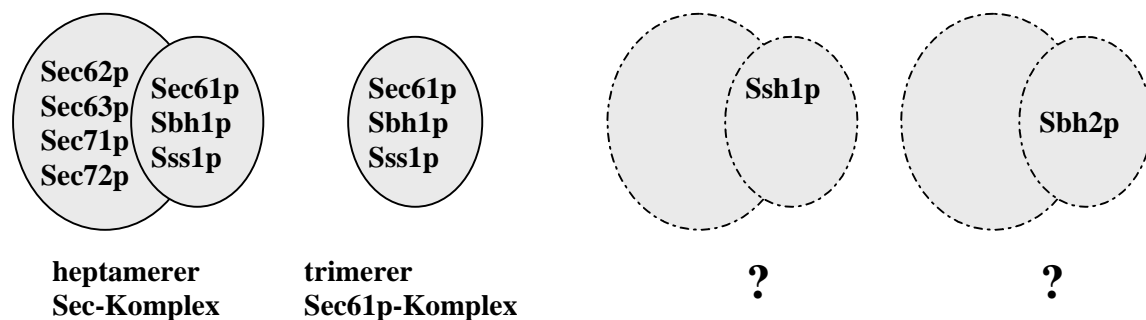
Abbildung 16. Präkursorakkumulation in den Sbh1p- und Sbh2p-Deletionsmutanten. Zellen eines wt-Stammes, der Deletionsmutanten $\Delta sbh1$ und $\Delta sbh2$ sowie der Doppelmutante $\Delta sbh1 \Delta sbh2$ wuchsen bei 30°C bis zur exponentiellen Phase und wurden dann für 2 h bei 38°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min mit [35 S]-Methionin markiert. Zellextrakte wurden hergestellt und für Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Kar2p oder α -Faktor verwendet. Die gefällten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie mit 10%igen (Kar2p) bzw. 15%igen (α -Faktor) Polyacrylamidgelen analysiert. preKar2 und pp α F sind die jeweiligen Präkursoren von Kar2p und α -Faktor.

Translokation von pp α F und des bakteriellen Proteins proOmpA getestet, die beide in einem *in vitro*-Translationssystem synthetisiert worden waren. In diesen Experimenten wurden nicht-sättigende Mengen von Mikrosomen eingesetzt (Sec62p wurde als Referenz benutzt und in Immunoblots quantifiziert), und die Menge an protease-geschütztem und somit transloziertem Protein wurde in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Mikrosomen aus der Doppelmutante $\Delta sbh1 \Delta sbh2$ transportierten beide Proteine mit einer im Vergleich zum wt-Stamm 2-5fach reduzierten Rate. Bei Verwendung von sättigenden Mengen an Mikrosomen war kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar.

Insgesamt zeigen die Analysen der Deletionsstämme, daß beide beta-Proteine, Sbh1p und Sbh2p, an der Proteintranslokation über die ER-Membran beteiligt, jedoch nicht essentiell für sie sind.

3.2.3. Der Ssh1p-Komplex

Den bisher dargelegten Ergebnissen zufolge spielen sowohl das Sec61p-Paraloge Ssh1p als auch das Sbh1p-Paraloge Sbh2p eine Rolle bei der Translokation von Proteinen über die ER-Membran. Es stellte sich im weiteren die Frage, ob die Assoziationseigenschaften dieser beiden Proteine ebenfalls denen von Sec61p bzw. Sbh1p vergleichbar sind. Hierzu wurde untersucht, mit welchen Bindungspartnern Ssh1p bzw. Sbh2p in der ER-Membran assoziieren können, ob ein vom Sec61p-Komplex distinkter Komplex mit den neu gefundenen Komponenten existiert, oder ob die jeweils paralogon Untereinheiten möglicherweise austauschbar sind.



3.2.3.1. Herstellung peptidspezifischer Antikörper gegen Ssh1p und Sbh2p und Immunoblot-Analyse diverser Deletionsstämme

Für diese Untersuchungen wurden peptidspezifische Antikörper gegen den C-Terminus des Ssh1-Proteins sowie gegen den N-Terminus des Sbh2-Proteins hergestellt, deren Spezifität in Immunoblots mit Membranen aus wt-Zellen und den entsprechenden Deletionsstämmen (Δ ssh1 bzw. Δ sbh2) überprüft wurde (Abbildung 17). Die Antikörper gegen Ssh1p erkennen mehrere dicht beieinander liegende Banden (Bahn 4), die sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität ähnlich wie Sec61p (Bahn 1-3) verhalten. In Δ ssh1-Stämmen fehlen alle diese Banden (Bahn 5), so daß man davon ausgehen kann, daß sie alle Ssh1p repräsentieren. Ein weiterer peptidspezifischer Antikörper, diesmal gegen den N-Terminus des Ssh1-Proteins zeigte das gleiche Phänomen (nicht gezeigt). Der Grund für die Heterogenität ist bislang ungeklärt. Die Antikörper gegen Sbh2p erkennen eine Bande von etwa 10 kD (Bahn 4), die in Stämmen fehlte, in denen das SBH2-Gen deletiert war (Bahn 6). Diese Antikörper waren spezifisch für Sbh2p im Gegensatz zu denen gegen Sbh1p, die eine Kreuzreaktivität zu Sbh2p aufweisen (Bahn 1).

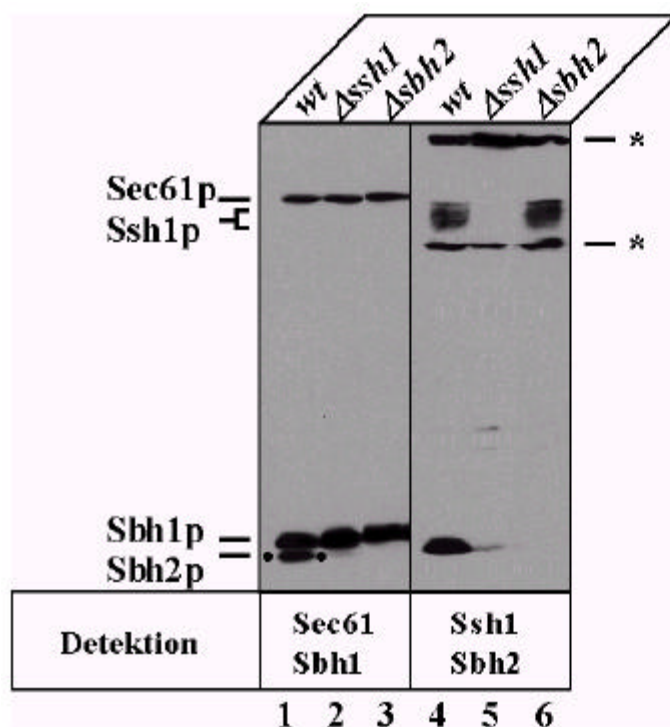


Abbildung 17. Spezifität der Antikörper gegen Ssh1p und Sbh2p. Membranen wurden aus exponentiell wachsenden Zellen eines wt-Stammes bzw. der Mutanten Δ ssh1 und Δ sbh2 präpariert und durch SDS-PAGE mit 13%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, bevor sie für Immunoblots mit Antikörpern gegen Ssh1p und Sbh2p bzw. Sec61p und Sbh1p eingesetzt wurden. Die Punkte markieren die Position von Sbh2p, mit dem die Antikörper gegen Sbh1p im Blot kreuzreagieren, die Sterne unspezifische Banden, die durch die Antikörper gegen Ssh1p erkannt werden.

Auffällig ist, daß die Deletion des SSH1-Gens zu einem drastischen Absinken des Sbh2p-Gehalts in den Zellen führt (Bahn 2). Möglicherweise wird Sbh2p erst durch die Interaktion mit Ssh1p stabilisiert. Umgekehrt ist dies nicht der Fall: Δ sbh2-Zellen weisen normale Mengen an Ssh1p auf (Bahn 3). Die Immunoblotanalyse wurde auf weitere Deletionsstämme ausgedehnt (Abbildung 18).

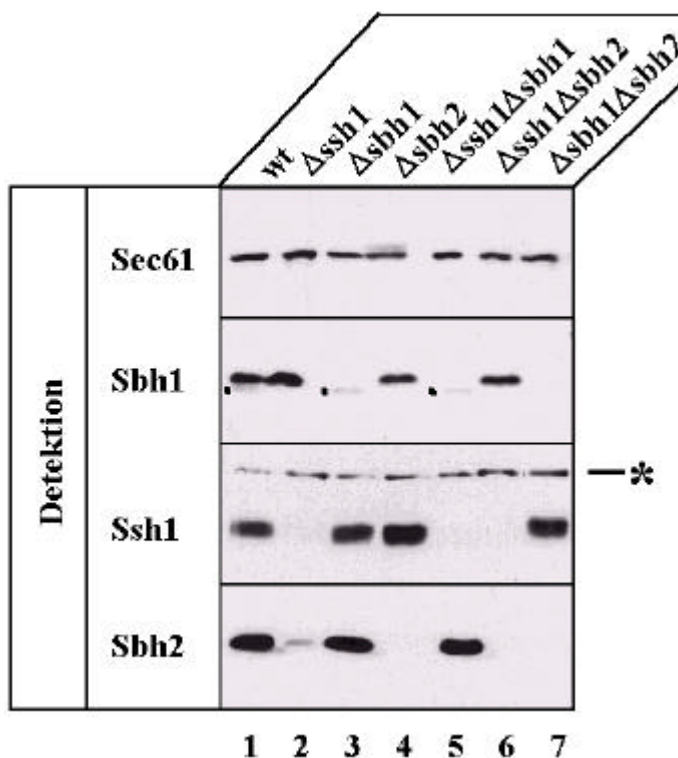


Abbildung 18. Immunoblot-Analyse diverser SSH1-, SBH1- und SBH2-Deletionsmutanten. Untersuchung der Mutanten wie in der Legende zu Abb. 17 beschrieben.

Dabei zeigte sich interessanterweise, daß bei Deletion des SBH1-Gens zusätzlich zum SSH1-Gen der Sbh2p-Gehalt nicht reduziert, sondern in wt-Mengen vorhanden war (Bahn 5). Sowohl Sec61p als auch Sbh1p blieben in ihrer Expression unbeeinflußt, wenn das SSH1- oder SBH2-Gen deletiert waren (Bahnen 2, 4 und 6).

3.2.3.2. Der Ssh1p-Komplex in wt-Zellen

Die Antikörper wurden im folgenden für Koimmunpräzipitationen eingesetzt, um zu klären, welche Proteine miteinander assoziieren. Dazu wurden Hefemikrosomen aus Zellen eines wt-Stammes in Digitonin solubilisiert und der Extrakt nach Zentrifugation mit Antikörpern gegen Ssh1p und Sbh2p sowie Sec61p, Sbh1p, Sss1p, Sec62p und Sec71p immunpräzipitiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Präzipitate in SDS-Gelen. Die daraus hergestellten Blots wurden mit diversen Antikörpern inkubiert. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

Wie erwartet präzipitierten die Antikörper gegen Sec61p, Sbh1p und Sss1p wechselseitig alle drei Untereinheiten des trimeren Sec61p-Komplexes (Bahnen 1-3). Die Antikörper gegen Sbh1p und Sss1p fällten zudem noch Sec62p, Sec71p und Sec72p (Bahnen 2 und 3) als Komponenten des heptameren Sec-Komplexes. Umgekehrt präzipitierten die Antikörper gegen Sec62p und Sec71p alle Untereinheiten des trimeren Sec61p-Komplexes sowie die übrigen des Sec-Komplexes (Bahnen 6 und 7). Unerwartet war, daß die Antikörper gegen Sec61p nur Sbh1p und Sss1p, nicht aber die übrigen Komponenten des Sec-Komplexes Sec62p, Sec71p und Sec72p präzipitierten. Möglicherweise blockieren hier die zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper den Teil des Sec61-Proteins, der für die Wechselwirkung mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex verantwortlich ist. Umgekehrt wurde Sec61p, wie oben schon gesagt, durch die Antikörper gegen Sec62p und Sec71p gefällt.

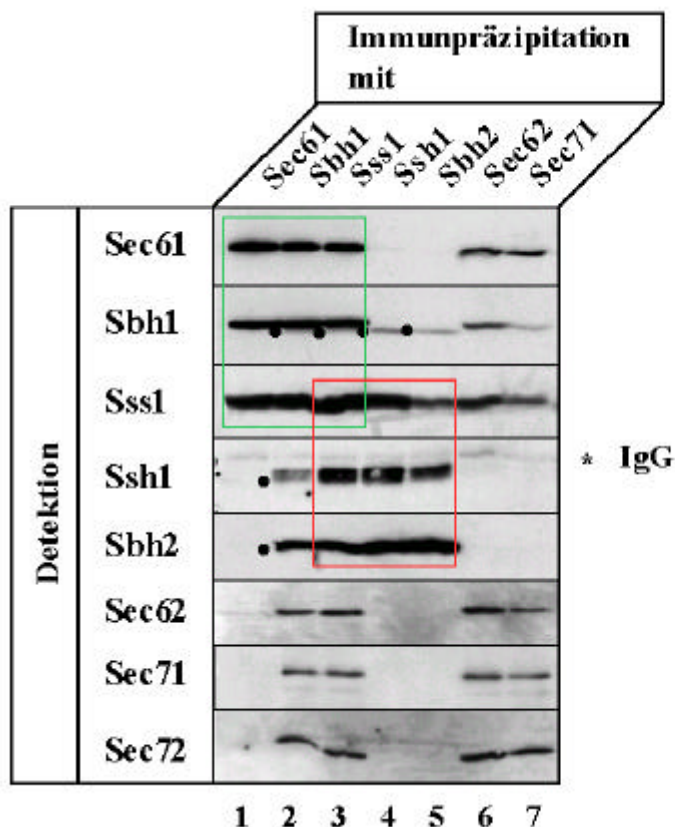


Abbildung 19. Untersuchung der Assoziation von Translokationskomponenten durch Koimmunopräzipitation. Mikrosomen aus wt-Zellen wurden mit Digitonin solubilisiert, Aliquots dieses Detergenzextraktes entsprechend 10 eq Mikrosomen (eq. 1 Äquivalent ist definiert als 1 μ l einer Membransuspension mit OD_{280nm} von 50) wurden mit diversen Antikörpern immunopräzipitiert. Das gefällte Material wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die kopräzipitierten Proteine mittels diverser Antikörper analysiert. Der Stern rechts markiert die Position der schweren Kette der Immunglobuline; die Punkte kennzeichnen Proteinbanden, die durch die Kreuzreaktivität der gegen Sbh1p gerichteten Antikörper mit Sbh2p in der Immunopräzipitation (Bahn 2) und/oder im Blot (Sbh1p-Detektion) verursacht werden. Grün bzw. rot eingerahmt sind die Banden, die die Assoziation der Komponenten des trimeren Sec61p-Komplexes bzw. des trimeren Sshlp-Komplexes widerspiegeln.

Die Antikörper gegen die neuen Proteine Ssh1p und Sbh2p präzipitierten wechselseitig beide Proteine und zudem Sss1p (Bahnen 4 und 5). Umgekehrt wurden Ssh1p und Sbh2p auch durch die Antikörper gegen Sss1p gefällt, die wie oben bereits gesagt auch alle Komponenten des Sec61p- und des Sec-Komplexes präzipitierten (Bahn 3). Daraus läßt sich schlußfolgern, das Sss1p nicht nur Bestandteil dieser beiden Komplexe, sondern auch eines neuen trimeren Komplexes bestehend aus Ssh1p, Sbh2p und Sss1p ist. Dieser Komplex scheint aber distinkt vom Sec61p-Komplex zu sein, da Antikörper gegen Sec61p weder Ssh1p noch Sbh2p präzipitierten (Bahn 1). Für die Antikörper gegen Sbh1p war das zwar zu einem geringen Teil der Fall (Bahn 2), was aber sehr wahrscheinlich auf die bereits oben genannte Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Sbh2p zurückzuführen ist. Umgekehrt konnten weder Sec61p und Sbh1p noch die übrigen Komponenten des großen Sec-Komplexes durch Antikörper gegen Ssh1p oder Sbh2p gefällt werden (Bahnen 4 und 5). Antikörper gegen Sec62p oder Sec71p wiederum präzipitierten weder Ssh1p noch Sbh2p (Bahnen 6 und 7).

Den Ergebnissen der Immunpräzipitationen zufolge, ist Sss1p als einzige Komponente allen genannten Komplexen gemeinsam. Auch wenn sich in der Datenbank keine Hinweise auf ein paraloges Sss1-Protein finden ließen, war denkbar, daß die gamma-Untereinheiten der beiden trimeren Komplexe nicht identisch sind, sondern zwei paraloge Proteine von demselben peptidspezifischen Antikörperserum erkannt werden. Um dies zu untersuchen, wurden Membranen aus einem Hefestamm (YTX80) präpariert, in dem das SSS1-Gen deletiert ist und die essentielle Funktion des Proteins durch das Sec61 γ -

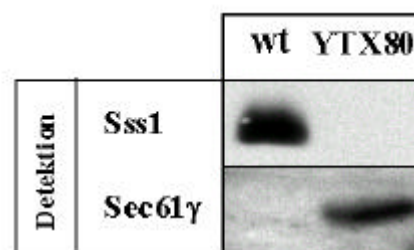
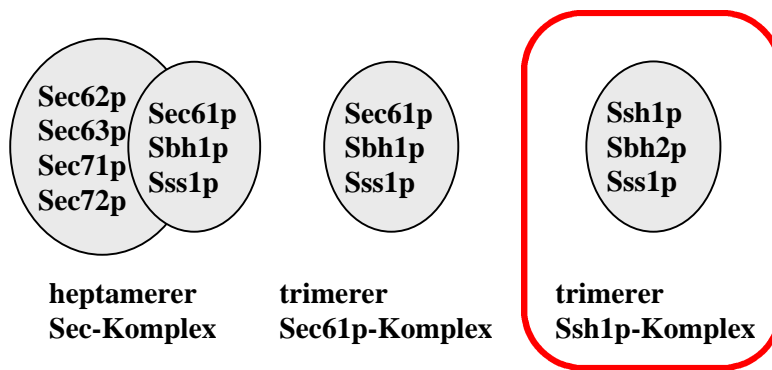


Abbildung 20. Immunoblotanalyse eines wt-Stammes und der Mutante YTX80 (Δ SSS1:ADE2 pGAL-Sec61 γ) mit Antiseren gegen Sss1p und das Säuger Sec61 γ -Protein.

Protein aus Säugern kompensiert wird (Hartmann et al., 1994). Im Immunoblot konnte für diese Membranen bei Einsatz der Antikörper gegen Sss1p keine Bande nachgewiesen werden (Abbildung 20). Dies zeigte, daß es in *S. cerevisiae* kein zweites, zum Sss1p paraloges Protein gibt, das durch das verwendete Antiserum erkannt wird. Somit muß die dritte Untereinheit des Ssh1p-Komplexes in der Tat Sss1p sein.



Zusammenfassend ergibt sich daraus folgendes Bild:

Vom trimeren Sec61p-Komplex klar abgegrenzt bilden die neu entdeckten Proteine Ssh1p und Sbh2p zusammen mit Sss1p einen distinkten trimeren Komplex, im folgenden der Ssh1p-Komplex genannt. Dieser

kann zumindest unter den gewählten Immunpräzipitationsbedingungen mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex offenbar nicht zu einem stabilen heptameren Komplex assoziieren. Dies schließt jedoch nicht aus, daß der Ssh1p-Komplex mit weiteren Proteinen in der ER-Membran assoziiert vorliegen könnte.

Um dies zu untersuchen, wurde der Ssh1p-Komplex mittels Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt (S. Panzner und K. Plath). Dazu wurde ein Digitoninextrakt aus Hefemikrosomen an einer Q-Sepharose-Säule chromatographiert, wie bei Panzner et al. (1995) beschrieben. Diese Säule bindet den heptameren Sec-Komplex, während der trimere Sec61p-Komplex und der Ssh1p-Komplex sich im Durchlauf befinden. Die letzteren wurden im folgenden an SP-Sepharose gebunden und mit steigendem Salzgradienten eluiert. Abbildung 21 (K. Plath) zeigt zum einen ein Coomassie-gefärbtes Gel der eluierten Fraktionen (A), zum anderen einen Immunoblot eben dieser Fraktionen, der mit Antikörpern gegen die Komponenten der trimeren Sec61- und Ssh1p-Komplexe inkubiert wurde (B).

Der trimere Sec61p-Komplex eluierte hauptsächlich in den Fraktionen 10 und 11 (Pfeil 1), wie mittels der Antikörper gegen Sec61p, Sbh1p und Sss1p im Immunoblot erkennbar ist (Abb. 21B). Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt in diesen Fraktionen noch zusätzliche Proteine, die jedoch nicht exakt koeluieren. Das Ssh1-Protein eluierte in drei Peaks. Der mittlere davon in Fraktion 12 (Pfeil 2), stellt den trimeren Komplex aus Ssh1p, Sbh2p und Sss1p dar. In den Fraktionen 15 und 16 (Pfeil 3) findet sich ebenfalls ein trimerer Ssh1p-Komplex, bei dem allerdings das Sbh2-Protein in einer verkürzten, möglicherweise degradierten Form vorliegt. Proteinsequenzierung ergab, daß dieser Sbh2p-Variante im Vergleich zum vollständigen Protein die ersten 15 Aminosäurereste am N-Terminus fehlen (siehe auch Legende zu Abbildung 21). Hierdurch läßt sich auch erklären, warum dieses verkürzte Protein von den peptidspezifischen Antikörpern, die gegen den N-Terminus gerichtet sind, nicht erkannt wird (Abb. 21B, Fraktionen 15 und 16). Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt, daß in den Fraktionen, in denen die beiden trimeren Ssh1p-Komplexe eluierten, keine weiteren Proteine in nennenswerten Mengen zu finden waren, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der Ssh1p-Komplex tatsächlich nur aus den drei identifizierten

Komponenten besteht. Ein geringer Teil des Ssh1-Proteins eluierte in den Fraktionen 6 und 7 (Pfeil 4), was jedoch nur im Immunoblot, nicht im Coomassie-gefärbten Gel zu erkennen war. Hierbei handelte es sich um einen dimeren Komplex aus Ssh1p und Sss1p. Ob dieser dimere Komplex ebenso wie der trimere Ssh1p-Komplex mit dem verkürzten Sbh2-Protein *in vivo* in der Hefezelle existiert und dort möglicherweise eine Rolle beim Auf- und Abbau des vollständigen trimeren Ssh1p-Komplexes spielt, oder ob es sich bei diesen Varianten lediglich um Reinigungsartefakte handelt, ist bislang nicht geklärt.

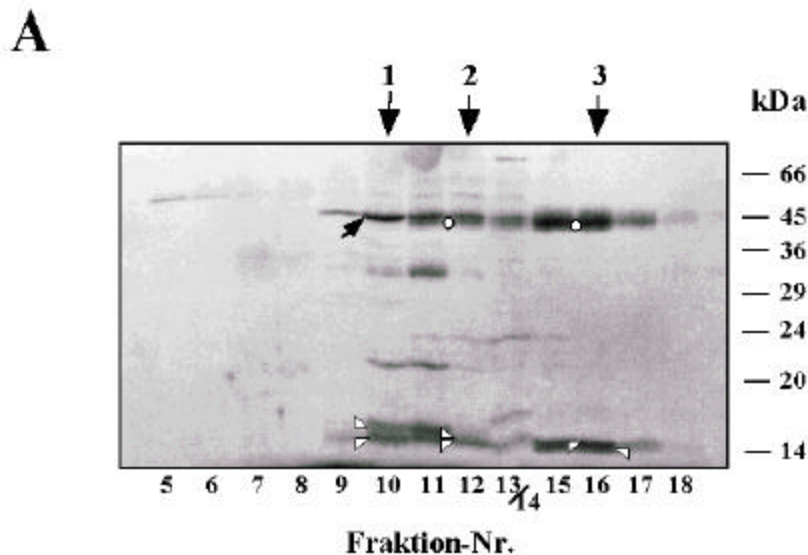
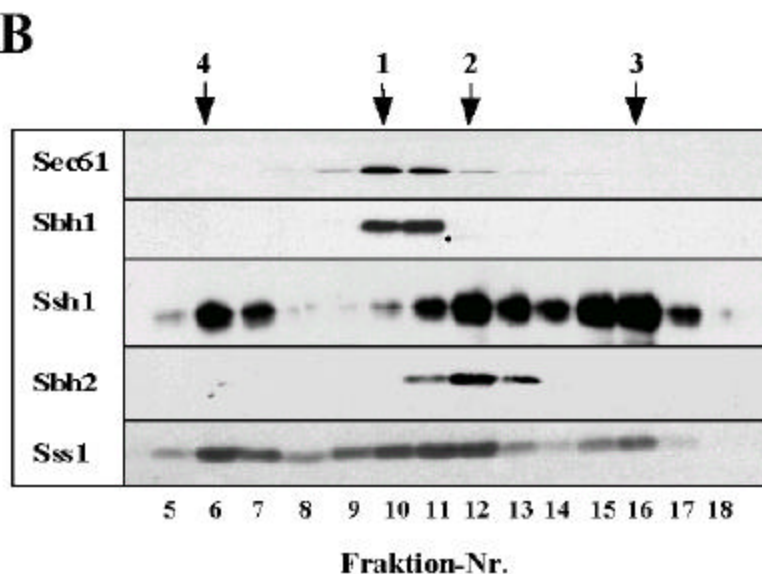


Abbildung 21. Reinigung des Ssh1p-Komplexes. Gezeigt ist der letzte Reinigungsschritt, in dem die Proteine auf einer SP-Sepharose-Säule aufgetrennt wurden. (A) Die Proteine aus den einzelnen Fraktionen, jeweils 1000 eq Mikrosomen entsprechend, wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt. Die nummerierten Pfeile über dem Gel markieren die Position der verschiedenen Komplexe: Pfeil 1, trimere Sec61p-Komplex aus Sec61p (kleiner Pfeil), Sbh1p (mittleres Dreieck) und Sss1p (unteres Dreieck); Pfeil 2, trimere Ssh1p-Komplex aus Ssh1p (Kreis), Sbh2p und Sss1p (Dreiecke, die beiden Proteine komigrieren); Pfeil 3, Ssh1p-Komplex aus Ssh1p (Kreis), Sss1p (linkes Dreieck, die obere Bande) und einer N-terminal verkürzten Form des Sbh2p (rechtes Dreieck, die untere Bande; die N-terminale Sequenz dieses Proteins wurde bestimmt als RRQAQSIKEKQAKQTPT und entspricht damit Sbh2p, beginnend mit Aminosäurerest 16 des vollständigen Proteins). (B) Immunoblot-Analyse der in (A) gezeigten Fraktionen mit diversen Antikörpern. Die eingesetz-



ten Proben entsprechen jeweils 20 eq Mikrosomen. Die nummerierten Pfeile über dem Gel markieren die Position der verschiedenen Komplexe. Pfeil 4, dimerer Komplex aus Ssh1p und Sss1p, der nur in geringen Mengen vorkommt (nicht sichtbar auf dem in (A) gezeigten Coomassie-gefärbten Gel). Der Punkt kennzeichnet eine Proteinbande, die durch die Kreuzreaktivität der gegen Sbh1p gerichteten Antikörper mit Sbh2p im Blot verursacht wird.

3.2.3.3. Austauschbarkeit der beta-Untereinheiten

Die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts zeigten, daß der trimere Sec61p-Komplex und der trimere Ssh1p-Komplex normalerweise als distinkte Komplexe in der Hefezelle vorliegen. Uns interessierte nun, ob ein Austausch der paralogen Untereinheiten prinzipiell möglich ist, ob es also Bedingungen gibt, unter denen sich Mischkomplexe aus Komponenten beider trimeren Komplexe bilden. Da die gamma-Untereinheit in beiden Komplexen identisch ist und die alpha-Untereinheiten Sec61p und Ssh1p nicht austauschbar sind (vgl. dazu beispielsweise Abschnitt 3.2.1.2.), konzentrierte sich die Untersuchung auf die beiden nicht-essentiellen beta-Untereinheiten Sbh1p und Sbh2p. Es stellte sich die Frage, ob bei Deletion einer beta-Untereinheit der beiden trimeren Komplexe das jeweils paraloge Protein die Funktion des fehlenden übernehmen würde. Um dies zu untersuchen, wurden Digitoninextrakte aus $\Delta sbh1$ - bzw. $\Delta sbh2$ -Deletionsstämmen für Koimmunpräzitations-experimente ähnlich wie für den wt-Stamm (vgl. Abb. 19) eingesetzt. Abbildung 22 zeigt, daß Antikörper gegen Sec61p nicht Sbh2p präzipitierten, wenn Sbh1p fehlte (Bahn 1), und daß umgekehrt, Antikörper gegen Ssh1p nicht Sbh1p präzipitierten, wenn Sbh2p fehlte (Bahn 10). Die Kontrollen zeigten, daß die verbleibende beta-Untereinheit mit ihren normalen Partnern assoziierte (Bahnen 3-5 und 7-9) und nicht mit der alpha-Untereinheit des jeweils paralogen Komplexes. Wie im wt-Stamm kam es auch hier in keinem Fall zu einer Assoziation von

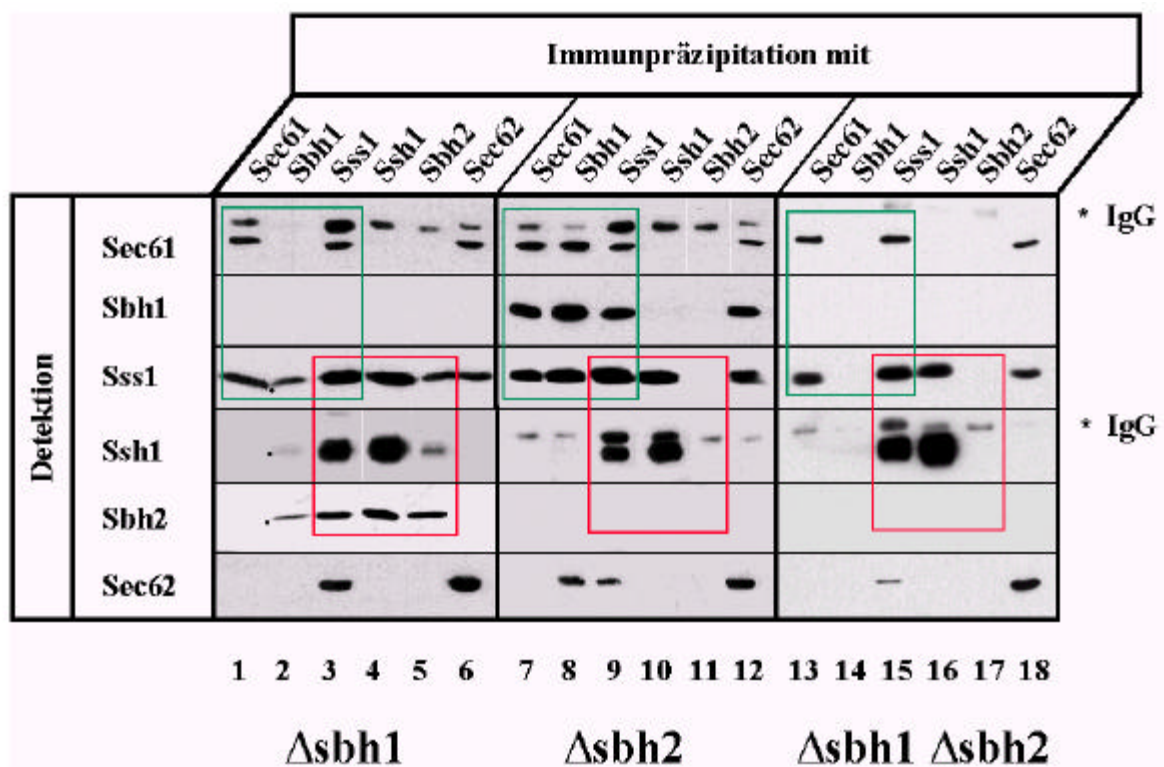


Abbildung 22. Koimmunpräzitation von Translokationskomponenten in beta-Deletionsstämmen. Mikrosomen aus Mutanten, denen entweder das SBH1-Gen (Bahnen 1-6), das SBH2-Gen (Bahnen 7-12) oder beide (Bahnen 13-18) fehlten, wurden in Digitonin solubilisiert. Aliquots dieses Detergenzextraktes, entsprechend jeweils 10 eq Mikrosomen, wurden für Immunpräzitationen mit diversen Antikörpern eingesetzt. Das gefällte Material wurde in SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die kopräzipitierten Proteine durch Immunoblot mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Die Sterne markieren die Position der schweren Kette der Immunglobuline, die Punkte kennzeichnen Proteinbanden, die durch die Kreuzreaktivität der gegen Sbh1p gerichteten Antikörper mit Sbh2p in der Immunpräzitation verursacht werden. Grün bzw. rot eingerahmte sind die Banden, die die Assoziation der Komponenten des Sec61p- bzw. Ssh1p-Komplexes widerspiegeln.

Sec62p zu den Komponenten des Ssh1p-Komplexes. Das Vorliegen dimerer Komplexe in den untersuchten Einzeldelensionsstämmen wurde durch Kofraktionierung der Proteine an SP-Sepharose bestätigt (K. Plath, nicht gezeigt). In gleicher Weise wurde die Doppeldeletionsmutante $\Delta sbh1 \Delta sbh2$ untersucht (Bahnen 13-18). In diesem Fall liegen sowohl der Sec61p- als auch der Ssh1p-Komplex in dimerer Form vor.

In den beta-Einzel- und -Doppeldeletionsmutanten konnten somit keine Hinweise auf die mögliche Austauschbarkeit der beta-Untereinheiten Sbh1p und Sbh2p gefunden werden. Die Untersuchung diesbezüglich wurde jedoch noch auf eine weitere Mutante ausgedehnt, die sich bereits in der Immunoblotanalyse hinsichtlich des Sbh2p auffällig gezeigt hatte (vgl. Abschnitt 3.2.3.1.): Während in der Mutante $\Delta ssh1$ der Gehalt an Sbh2p gegenüber dem Wildtyp drastisch reduziert ist, ist er in der Doppeldeletionsmutante $\Delta ssh1 \Delta sbh1$ dem in wt-Zellen vergleichbar (Abbildung 18, Bahnen 1 und 5). Tatsächlich zeigten Koimmunpräzitations-experimente mit Extrakten aus der Mutante $\Delta ssh1 \Delta sbh1$ (Abbildung 23; Bahnen 13-18), daß unter diesen Bedingungen Antikörper gegen Sbh2p Sec61p kopräzipitierten (Bahn 17) und

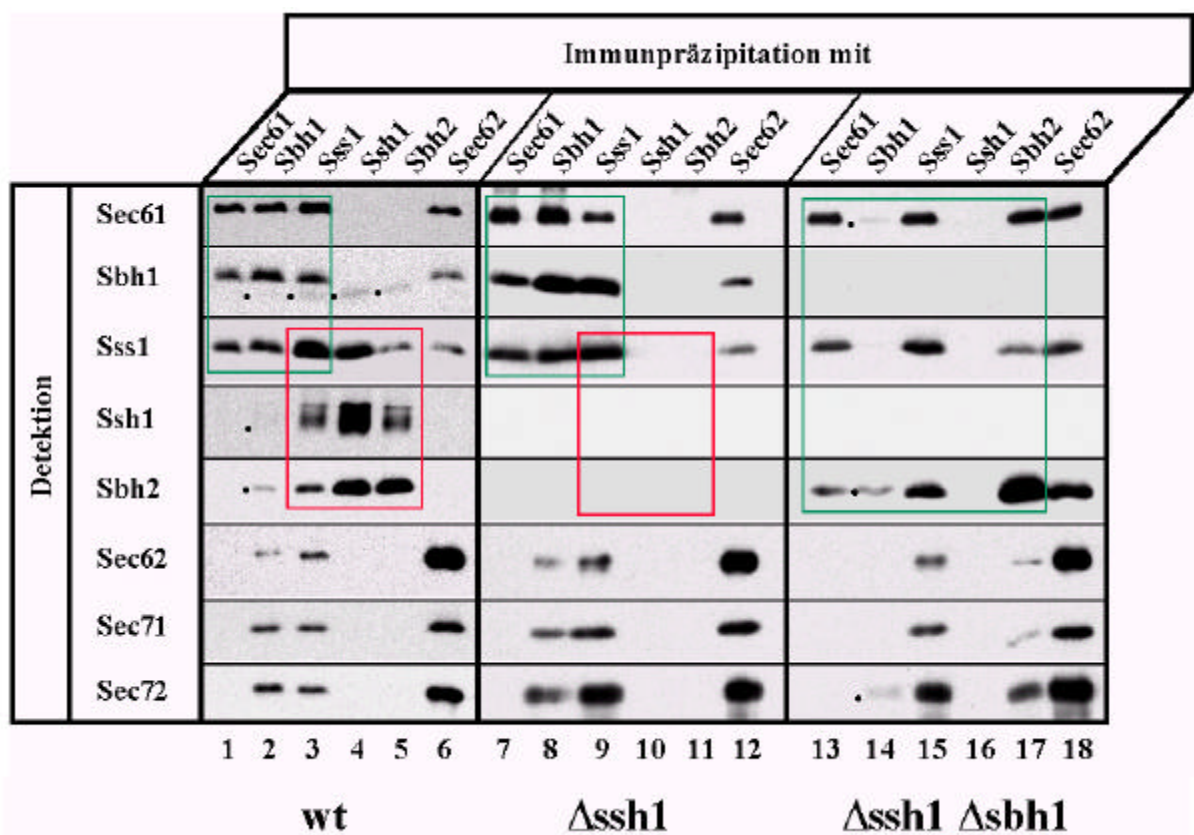
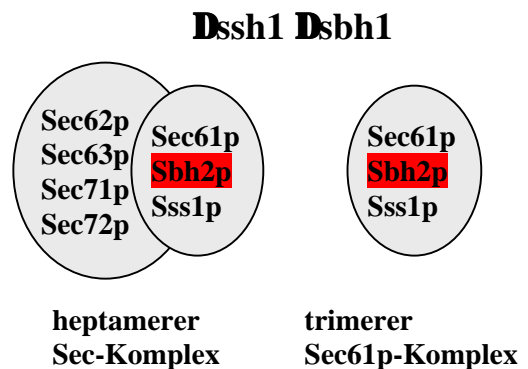


Abbildung 23. Ein mutanter Sec61p-Komplex in der Deletionsmutante $\Delta ssh1 \Delta sbh1$. Mikrosomen aus wt-Zellen oder aus Mutanten, denen entweder das SSH1-Gen oder das SSH1- und das SBH1-Gen fehlten, wurden in Digitonin solubilisiert. Aliquots dieses Detergenzextraktes, entsprechend jeweils 10 eq Mikrosomen, wurden für Immunpräzitationen mit diversen Antikörpern eingesetzt. Die Auftrennung des gefällten Materials erfolgte in SDS-Gelen, die Analyse der kopräzipitierten Proteine anschließend durch Immunoblot mit verschiedenen Antikörpern. Die Punkte kennzeichnen Proteinbanden, die durch die Kreuzreaktivität der gegen Sbh1p gerichteten Antikörper mit Sbh2p in der Immunpräzitation (Bahnen 2 und 14) und/oder im Blot (Sbh1p-Detektion) verursacht werden. Grün bzw. rot eingrahmt sind die Banden, die die Assoziation der Komponenten des trimeren Sec61p-Komplexes bzw. des trimeren Ssh1p-Komplexes widerspiegeln.

umgekehrt Sbh2p mit Antikörpern gegen Sec61p gefällt werden konnte (Bahn 13). Zum direkten Vergleich sind Koimmunpräzipitationen aus Extrakten von wt-Zellen (Bahnen 1-6) und dem Deletionsstamm Δ ssh1 (Bahnen 7-12) gezeigt. Einzig in der Mutante Δ ssh1 Δ sbh1 konnte Sbh2p auch durch die Antikörper gegen Sec62p präzipitiert werden (Bahn 18).

Die Untersuchung dieser Mutante ergab somit, daß eine Assoziation der beta-Untereinheit des einen Komplexes mit den Komponenten des anderen möglich ist: Sbh2p assoziiert mit Sec61p, wenn beiden Proteinen der ursprüngliche Partner fehlt.

Zudem ist offenbar die Assoziation dieses mutanten trimeren Sec61p-Komplexes mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex zum großen Sec-Komplex möglich und wird durch Sbh2p nicht behindert. Dies deutet darauf hin, daß Sequenz- oder Struktureigenschaften des Ssh1p selbst für die mangelnde Assoziationsfähigkeit des trimeren Ssh1p-Komplexes mit dem Sec62p/Sec63p-Komplex verantwortlich sind.



Zusammengefaßt zeigen die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse, daß normalerweise die beta-Untereinheiten zwischen den Komplexen nicht ausgetauscht werden, sondern daß distinkte dimere und trimere Komplexe nebeneinander in der Zelle existieren können. Prinzipiell scheint ein Austausch jedoch möglich zu sein.

3.2.3.4. Der Ssh1p-Komplex in der ts-Mutante *sec61-2*

Die bislang dargestellten Untersuchungen zum Assoziationsverhalten des Ssh1p-Komplexes ließen keine Bindung zum Sec62p/Sec63p-Komplex erkennen, wie sie für den Sec61p-Komplex nachweisbar ist. Es stellte sich die Frage, ob der Ssh1p-Komplex den Sec61p-Komplex im heptameren Sec-Komplex ersetzen würde, falls durch Mutation des Sec61p oder Reduktion des zellulären Sec61p-Gehaltes die Assoziationsmöglichkeiten der Komponenten des Sec61p-Komplexes mit denen des Sec62p/Sec63p-Komplexes beeinträchtigt wären.

Diese Bedingungen finden sich in der temperatur-sensitiven Mutante *sec61-2*: Die Mutation des Sec61p resultiert in verstärkter Dissoziation des trimeren Sec61p-Komplexes. Die Destabilisierung der Bindung zwischen den einzelnen Komponenten führt zu einem schnelleren Abbau des mutanten Sec61p ebenso wie des Sss1p. Der Gehalt beider Proteine ist in dieser Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich verringert. Erstaunlicherweise trifft dies nicht für die dritte Komponente des trimeren Sec61p-Komplexes, Sbh1p, zu. Ebenso finden sich alle Komponenten des tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplexes in der Mutante in gleichen Mengen wie in Wildtyp-Zellen (Esnault et al., 1994; Biederer et al., 1996).

Untersucht wurde im folgenden, in welcher Zusammensetzung die einzelnen Komplexe in der ts-Mutante *sec61-2* vorliegen. Zu diesem Zweck wurden rauhe Mikrosomen aus *sec61-2*-Zellen isoliert, die bei 30°C gewachsen und nachfolgend für 2 h bei der nicht-permissiven Temperatur 38°C inkubiert worden waren. Daraus gewonnene Digitoninextrakte wurden für

Koimmunpräzitationen mit diversen Antikörpern verwendet. Die Präzitate wurden im Immunoblot analysiert.

Die Ergebnisse in Abbildung 24 zeigen das Bild des destabilisierten Sec61p-Komplexes in den *sec61-2*-Zellen: Die Antikörper gegen Sec61p präzipitieren nur Sec61p selbst, weder Sbh1p noch Sss1p (Bahn1). Der Grund dafür könnte darin liegen, daß das mutante Sec61p nur äußerst labile Wechselwirkungen zu anderen Proteinen eingehen kann und daß die Bindung des Antikörpers an das *sec61-2*-Protein jede andere Assoziation unmöglich macht.

Umgekehrt wird das mutante Sec61p durch Antikörper gegen alle drei Komponenten des trimeren Sec61p-Komplexes ebenso wie durch Antikörper gegen Sec62p präzipitiert (Sec61-Detektion; lange Exposition !), so daß man davon ausgehen kann, daß in den Zellen, wenn auch in geringen Mengen, sowohl der trimere Sec61p-Komplex als auch der heptamere Sec-Komplex zu finden ist.

Sbh1p scheint bei unvermindertem zellulären Gehalt im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (vgl. Biederer et al., 1996) überwiegend isoliert vorzuliegen: Antikörper gegen Sbh1p präzipitieren im wesentlichen nur Sbh1p selbst (Bahn 2), die übrigen Komponenten des Sec61p-Komplexes und des Sec62p/Sec63p-Komplexes nur in sehr geringem Maße (detektierbar nur in langen Expositionen der Blots). Sbh1p ist somit entweder ohne Assoziation mit anderen Proteinen in der ER-Membran stabil, oder es wird durch andere, bislang nicht bekannte Membranproteine stabilisiert.

Der zelluläre Gehalt des Sss1p ist, wie bereits oben gesagt, ebenso wie der des Sec61p in der *sec61-2*-Mutante reduziert. Das verbleibende Sss1p findet sich ähnlich wie das Sbh1p zu einem geringen Teil im Sec61p- bzw. Sec-Komplex wieder (Bahn 3), zum größten Teil ist es jedoch in dem Ssh1p-Komplex assoziiert (Bahnen 3-5).

Der Ssh1p-Komplex liegt wie in wt-Zellen in seiner trimeren Form vor (Bahnen 3-5), eine Assoziation mit Komponenten des tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplexes ist nicht nachweisbar. Letzterer scheint, soweit es die Analyse zuläßt, hauptsächlich in seiner tetrameren Form und zu einem geringen Anteil auch als Sec-Komplex vorzuliegen: Sec62p,

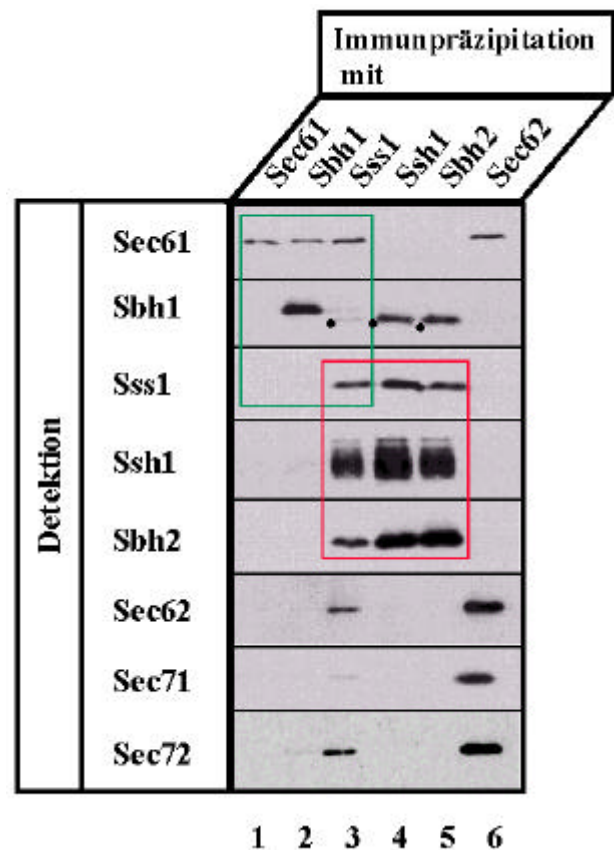


Abbildung 24. Immunpräzitationen von Translokationskomponenten aus der ts-Mutante *sec61-2*. Mikrosomen wurden aus Zellen der ts-Mutante *sec61-2* nach 2-stündiger Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur von 38°C isoliert. Daraus hergestellte Digitoninextrakte wurden für Immunpräzitationen mit diversen Antikörpern eingesetzt. Das gefällte Material, entsprechend 10 eq Mikrosomen, wurde im SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit diversen Antikörpern analysiert. Die Punkte kennzeichnen Proteinbanden, die durch die Kreuzreaktivität der gegen Sbh1p gerichteten Antikörper mit Sbh2p im Blot verursacht werden. Grün bzw. rot eingerahmt sind die Banden, die die Assoziation der Komponenten des trimeren Sec61p-Komplexes bzw. des trimeren Ssh1p-Komplexes widerspiegeln.

Sec71p und Sec72p werden durch Antikörper gegen Sec62p (Bahn 6) und in geringerem Maße auch von Antikörpern gegen Sss1p und Sbh1p präzipitiert (Bahnen 2 und 3).

Unverändert scheint also auch unter diesen Bedingungen der Ssh1p-Komplex - obwohl er in weitaus stabilerer Form als der trimere Sec61p-Komplex in den *sec61-2*-Zellen vorliegt - keine Assoziation mit dem hier überwiegend freien tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex eingehen zu können. Berücksichtigt werden muß allerdings bei der Interpretation der Ergebnisse, daß es aufgrund der labilen Wechselwirkungen des mutanten Sec61p zu den anderen Membranproteinen innerhalb der Komplexe bereits unter den Reinigungsbedingungen zur Dissoziation eines Großteils der Komplexe kommen könnte. Möglicherweise liegt somit *in vivo* ein weitaus größerer Teil der Komponenten des trimeren Sec61p-Komplexes und des heptameren Sec-Komplexes assoziiert vor, als es die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationsexperimente widerspiegeln.

3.2.3.5. Ribosomenassoziation des Ssh1p-Komplexes

Der Sec61p-Komplex findet sich in *S. cerevisiae* zum Teil als trimere Komplex mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert, zum Teil als Bestandteil des heptameren Sec-Komplexes. Mit Hilfe des letzteren konnte der posttranslationale Transport *in vitro* rekonstituiert werden. Somit fungiert vermutlich der trimere, ribosomen-assoziierte Sec61p-Komplex als Translokationskomplex im kotranslationalen Transport, während der heptamere Sec-Komplex eine Rolle in der posttranslationalen Translokation spielt (Panzner et al., 1995). Die bisherigen Untersuchungen des Ssh1p-Komplexes in dieser Arbeit ergaben keine Hinweise auf eine Assoziation des trimeren Ssh1p-Komplexes mit dem Sec62p/Sec63p-Komplex. Somit wäre vorstellbar, daß der Ssh1p-Komplex möglicherweise, wie der trimere Sec61p-Komplex, eine Funktion in der kotranslationalen Translokation hat. Daher wurde abschließend geprüft, ob der Ssh1p-Komplex mit membrangebundenen Ribosomen assoziiert vorliegt.

Dazu wurden rauhe Mikrosomen aus exponentiell wachsenden Hefezellen mit Digitonin solubilisiert. Aus diesem Extrakt wurde durch Zentrifugation eine Überstandsfraktion (Digitoninextrakt, DE) und ein Ribosomenpellet gewonnen. Die Ablösung ribosomen-gebundener Membranproteine erfolgte anschließend durch Behandlung mit Puromycin unter hohen Salzkonzentrationen. Die so erhaltene Proteinfraction wird als RAMP-Fraktion (für ribosomen-assoziierte Membranproteine) bezeichnet. Sowohl die DE- als auch die RAMP-Fraktion wurden im Immunoblot mit diversen Antikörpern untersucht (Abbildung 25A)

Wie schon aus früheren Experimenten bekannt (Panzner et al., 1995) fand sich Sec62p als Repräsentant des großen Sec-Komplexes fast ausschließlich in der DE-Fraktion, während die Komponenten des trimeren Sec61p-Komplexes sowohl in der DE- als auch in der RAMP-Fraktion zu finden waren. Ssh1p und Sbh2p verhielten sich ähnlich, auch sie waren in beiden Fraktionen vertreten und lagen somit zum Teil in ribosomen-assoziiierter Form vor. Immunpräzipitationen der RAMPs mit Antikörpern gegen die Komponenten des Sec61p- und des Ssh1p-Komplexes zeigten, daß nur die jeweils zugehörigen Komponenten der einzelnen Komplexe, also Sec61p, Sbh1p und Sss1p bzw. Ssh1p, Sbh2p und Sss1p, präzipitiert wurden (Abbildung 25B). Somit ergab sich, daß jeder der beiden trimeren Komplexe für sich an Ribosomen gebunden ist. Antikörper gegen Sec62p konnten die Komponenten der beiden trimeren Komplexe aus der RAMP-Fraktion nicht präzipitieren.

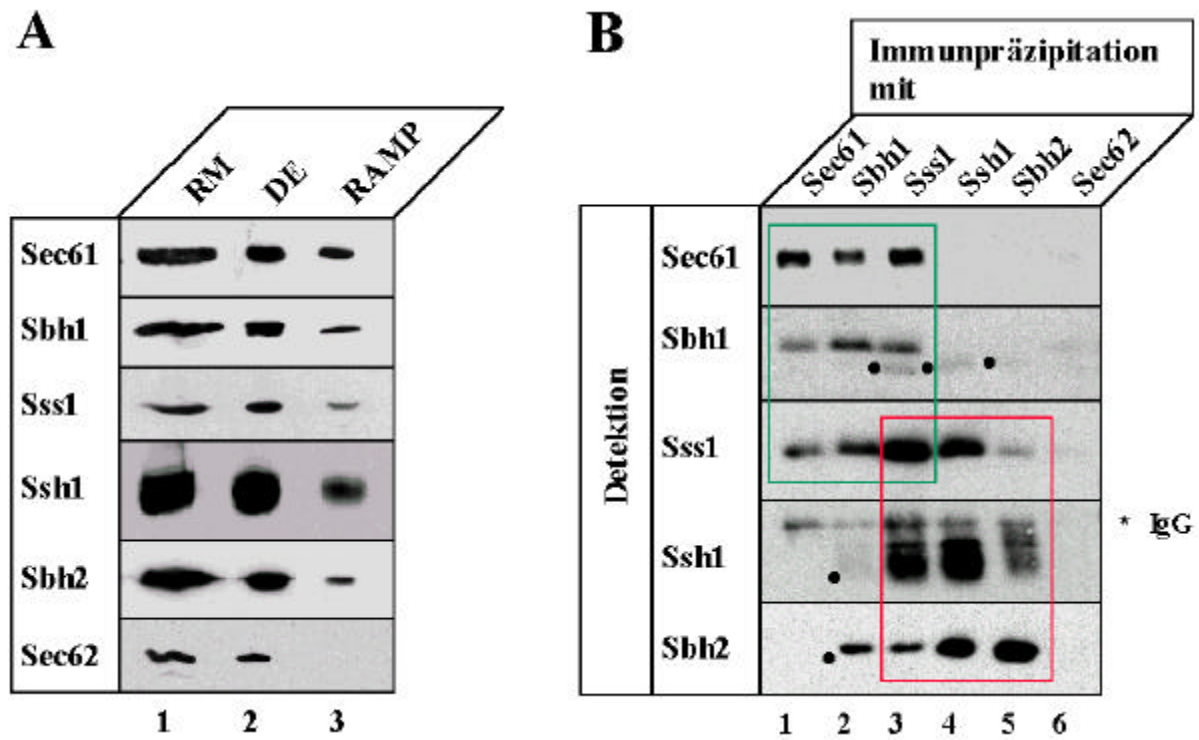


Abbildung 25. Der Ssh1p-Komplex findet sich in Assoziation mit membrangebundenen Ribosomen. **(A)** Hefemikrosomen (RM, rauhe Mikrosomen) wurden in einem Hochsalzpuffer, der 0,8 M Kaliumacetat enthielt, gewaschen, um periphere Membranproteine zu entfernen, und danach in Digitonin solubilisiert. Die anschließende Zentrifugation ergab einen Überstand, den Digitoninextrakt (DE) und ein Pellet, das die Ribosomen und mit ihnen assoziierte Membranproteine enthielt. Letztere wurden aus dem Pellet durch Behandlung mit Puromycin unter hohen Salzkonzentrationen herausgelöst (RAMP). Aliquots entsprechend 10 eq Mikrosomen wurden per SDS-PAGE und Immunoblot mit diversen Antikörpern analysiert. **(B)** Die RAMP-Fraktion (jeweils 20 eq Mikrosomen entsprechend) wurde für Koimmunpräzipitationsexperimente mit Antikörpern gegen Sec61p, Sbh1p, Sss1p, Ssh1p, Sbh2p und Sec62p eingesetzt. Die Analyse des gefällten Materials erfolgte durch SDS-PAGE und Immunoblot mit diversen Antikörpern. Die Sterne markieren die Position der schweren Kette der Immunglobuline, die Punkte kennzeichnen Proteinbanden, die durch die Kreuzreaktivität der gegen Sbh1p gerichteten Antikörper mit Sbh2p in der Immunpräzipitation (Bahn 2) und/oder im Blot (Sbh1p-Detektion) verursacht werden. Grün bzw. rot eingerahmt sind die Banden, die die Assoziation der Komponenten des trimeren Sec61p-Komplexes bzw. des trimeren Ssh1p-Komplexes widerspiegeln.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen somit, daß es sich bei dem Ssh1p-Komplex um einen eigenständigen trimeren Komplex handelt, der unabhängig vom trimeren Sec61p-Komplex in ribosomengebundener Form vorliegen kann. Dies und die Tatsache, daß der Ssh1p-Komplex zumindest unter den gewählten Präzipitationsbedingungen keine Assoziation mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex zeigte, macht eine Funktion im kotranslationalen Transport der Hefezelle wahrscheinlich.

4. Diskussion

Das Phänomen paraloger Gene und Proteine findet sich in prokaryotischen wie eukaryotischen Zellen gleichermaßen. Es läßt sich ursächlich auf Genduplikationsereignisse zurückführen, denen eine wichtige Rolle bei der Evolution von Makromolekülen zukommt. Nachweisen lassen sich Duplikationen einzelner Gene oder auch nur Gensegmente ebenso wie Duplikationen ganzer Chromosomenabschnitte, und zwar sowohl innerhalb eines Chromosoms (intrachromosomal) als auch zwischen verschiedenen Chromosomen (interchromosomal). Viele paraloge Gene sind gar infolge der Duplikation des gesamten Genoms eines Organismus entstanden. So wird beispielweise angenommen, daß das Säuger genom das Resultat mehrerer Genomduplikationen im Zuge der Evolution der Chordata ist (Lundin, 1993). Auf die Tetraploidisierung (Entstehung eines vierfachen Chromosomensatzes) folgte stets die Wiederherstellung des diploiden Zustandes unter Deletion der meisten, jedoch nicht aller duplizierten Gene. Auch für *S. cerevisiae* wird postuliert, daß das Hefegenom in seiner heutigen Form das Produkt einer Genomduplikation ist, die nach der Abspaltung von *Saccharomyces* von *Kluyveromyces* datiert wird. Hier blieb ebenfalls nur ein geringer Teil der Gene als Duplikat erhalten, die meisten wurden im Laufe der Zeit wieder deletiert. Dem Modell zufolge machen die Genpaare, die sich auf dieses Duplikationsereignis zurückführen lassen, 13 % aller Hefeproteine aus (Wolfe und Shields, 1997).

Die in dieser Arbeit untersuchten paralogen Paare SEC61/SSH1 und SBH1/SBH2 scheinen allerdings nicht zu den Resultaten dieser Genomduplikation zu gehören, da zumindest die Gene SSH1, SBH1 und SBH2 sich keiner der bislang identifizierten 55 duplizierten chromosomalen Regionen des Hefegenoms zuordnen lassen (K.H. Wolfe und D.C. Shields, <http://acer.gen.tcd.ie/~khwolfe/yeast/>, Yeast Gene Duplications Project). Zudem sind homologe Gene des SSH1 und des SBH2 mittlerweile auch in *Candida albicans* identifiziert worden (*Candida albicans* Sequencing Project, <http://candida.stanford.edu/>), was für eine Duplikation der entsprechenden Ursprungsgene vor der Aufspaltung der Sproßhefen (*Saccharomycetales*) in *Candidaceae* und *Saccharomycetaceae* spricht. Zu der letztgenannten Familie gehört neben der Gattung *Saccharomyces* unter anderem auch *Kluyveromyces*. Somit wären die Duplikationen, auf die sich die hier beschriebenen paralogen Paare zurückführen lassen, weitaus früher zu datieren als die oben genannte für *Saccharomyces* postulierte Genomduplikation.

Duplizierte SEC61-Gene finden sich in sehr unterschiedlichen Bereichen der Eukaryoten. Vergleich der Gene zeigt, daß sie auf mehrere unabhängige Duplikationsereignisse im Laufe der Evolution zurückzuführen sind. Bislang lassen sich mindestens drei solcher Ereignisse nachweisen: Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Duplikationen des SEC61-Gens in Hefen und in Säugerzellen, findet man auch in *Arabidopsis thaliana* zwei paraloge SEC61-Gene, die durch eine von den beiden erstgenannten unabhängige Duplikation entstanden sind (E. Hartmann, persönliche Mitteilung). Trotz der unterschiedlichen Lebensformen war die SEC61-Duplikation offenbar in allen genannten Fällen von selektivem Vorteil, so daß die Duplikate im folgenden erhalten blieben.

4.1. Die paralogen SEC61 α -Gene in Säugerzellen

Die beiden SEC61 α -Gene und deren Genprodukte in Säugerzellen sind im Gegensatz zu den paralogenen Hefegenen SEC61 und SSH1, die sich deutlich voneinander unterscheiden, hochgradig konserviert: Auf Nukleinsäureebene beträgt die Identität je nach Spezies zwischen 70 und 75%, auf Proteinebene gar 94%. Die Ursache für diese hohe Konserviertheit könnte darin liegen, daß das Duplikationsereignis, aus dem diese beiden Gene hervorgingen, entwicklungsgeschichtlich noch nicht sehr weit zurückliegt. Vorstellbar ist aber auch, daß auf den Genen ein hoher Selektionsdruck liegt. Möglicherweise sind die Komponenten des Translokationsapparates im Säuger so weit optimiert und aufeinander abgestimmt, daß keine größeren Variationen der einzelnen Moleküle mehr toleriert werden können.

Daraus ergibt sich die Frage, welche Bedeutung zwei nahezu identische Gene (und vermutlich auch Proteine) für die Säugerzelle haben. Ein paraloges Sec61 α -Protein könnte möglicherweise eine vergleichbare Funktion wie das bereits bekannte Sec61 α -Ip jedoch in einem anderen subzellulären Kompartiment ausüben. Dagegen sprechen allerdings erste Experimente, das Sec61 α -Iip in MDCK-Zellen per Immunfluoreszenz nachzuweisen. Gegen Sec61 α -Iip gerichtete Antikörper ergaben dasselbe Färbemuster wie Antikörper gegen Sec61 α -Ip (nicht gezeigt). Die Interpretation dieser Ergebnisse muß jedoch mit Vorsicht erfolgen, da die Spezifität des Antiserums gegen den C-Terminus des Sec61 α -Iip bislang nicht vollständig nachgewiesen ist (vgl. Abschnitt 3.1.2.).

Bei gleicher Lokalisation der paralogenen Sec61 α -Proteine im ER wäre auch eine durch bestimmte Faktoren induzierbare Expression des einen oder anderen Gens denkbar. Zudem werden in multizellulären Organismen zahlreiche Gene zelltyp-spezifisch exprimiert. In der Tat geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine Funktion des SEC61 α -II-Gens als regulierbare Einheit, um den Bedarf von Zellen an Translokationseinheiten individuell einstellen zu können:

Die Untersuchung der Expression beider Gene in verschiedenen Organen und Zelllinien mittels RT-PCR (vgl. Abb. 7) ergab in allen Fällen ein relativ konstantes Expressionsniveau für das SEC61 α -I-Gen, während das des SEC61 α -II-Gens deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Organen zeigte. Dabei war unter allen bislang getesteten Bedingungen die Expression beider Gene nachweisbar. Dies schließt jedoch die Möglichkeit einer zelltyp-spezifischen Expression des SEC61 α -II-Gens nicht aus, da die Untersuchungen bislang nicht an einzelnen Zellen durchgeführt wurden. Somit lassen sich die Ergebnisse dahingehend interpretieren, daß sich neben der konstitutiven Expression des SEC61 α -I-Gens die regulierte Expression des SEC61 α -II-Gens findet, letztere entweder in allen Zellen oder zelltyp-spezifisch. Außer diesen beiden Möglichkeiten wäre als dritte eine zelltyp-spezifische, aber konstitutive Expression des SEC61 α -II-Gens denkbar.

Für eine zelltyp-spezifische Expression spricht auch die Analyse des GC-Gehaltes beider SEC61 α -Gene in den vier untersuchten Säugerspezies. In allen Fällen wurde übereinstimmend für das SEC61 α -I-Gen ein hoher GC-Gehalt (> 50 %) und für das SEC61 α -II-Gen ein niedrigerer GC-Gehalt (< 50 %) ermittelt (vgl. Tab. 3). Häufig findet man sog. „Haushaltsgene“ („housekeeping genes“), die in allen Zellen exprimiert werden, in Bereichen der Säugerchromosomen, die sich durch einen relativ hohen GC-Gehalt auszeichnen, während zelltyp-spezifisch exprimierte Gene eher in AT-reichen Regionen lokalisiert sind (Craig und Bickmore, 1993).

Abgesehen von der unterschiedlichen Expressionshöhe in den einzelnen Organen fiel das SEC61 α -II-Gen durch die Bildung mehrerer distinkter verkürzter Transkripte neben dem Volle-Länge-Transkript auf, deren Bedeutung bislang völlig unklar ist. Die Möglichkeit, variante Isoformen des Sec61 α -Iip zu produzieren, erscheint insofern nicht sehr wahrscheinlich, als es in der Regel in den verkürzten Formen zu einem Rasterschub kommt, der kurze Zeit später zum Kettenabbruch führt. Auf der Basis der bisher zu Sec61 α -Ip vorliegenden funktionellen Daten ist schwer vorstellbar, welche Rolle diese verkürzten Proteine des Sec61 α -Iip spielen könnten.

Für eine weitere Analyse der unterschiedlichen Funktionen der beiden paralogen SEC61 α -Gene bzw. Proteine in Säugerzellen wird der Einsatz alternativer Nachweismethoden, die eine bessere Quantifizierbarkeit der Genexpression als die RT-PCR erlauben, erforderlich sein. Darüber hinaus könnte eine Analyse der Promotorregion beider SEC61 α -Gene unter Umständen Aufschlüsse über die Regulierbarkeit ihrer Expression und vermittels dieser auf potentiell unterschiedliche Funktionen geben.

Mit Abschluß der vollständigen Charakterisierung der Antikörper gegen den C-Terminus des Sec61 α -Iip stehen möglicherweise zwei spezifische Antisera gegen die paralogen Sec61 α -Proteine zur Verfügung, die Untersuchungen auf Proteinebene erlauben werden. Diese sollten eingesetzt werden, um zu untersuchen, ob das Sec61 α -Iip mit denselben Proteinen in der ER-Membran interagiert wie das Sec61 α -Ip, oder ob sich für die kleineren Untereinheiten des Sec61-Komplexes im Säuger ebenfalls paraloge Gene und Proteine finden. Letzteres würde im Säugersystem die Voraussetzung für die Bildung von distinkten Komplexen vergleichbar denen in *S. cerevisiae* sein.

Ob die verkürzten Transkripte des SEC61 α -II-Gens zu varianten Formen des SEC61 α -Iip translatiert werden, ließe sich mit diesen gegen den äußersten C-Terminus gerichteten Antikörpern allerdings nicht untersuchen. Auch bei anderen Methoden, zumal wenn der Nachweis keine Rückschlüsse auf die Größe des nachgewiesenen Moleküls erlaubt (z.B. bei *in-situ*-Hybridisierungen), bleibt der Aspekt der verkürzten Transkripte (und damit potentiell auch verkürzten Proteine) des SEC61 α -II-Gens bei der Interpretation der Ergebnisse stets zu berücksichtigen.

4.2. Der Ssh1p-Komplex - ein zweiter aktiver Translokationskomplex in der ER-Membran von *S. cerevisiae*

Für die Hefe *S. cerevisiae* konnte die vorliegende Arbeit nicht nur die Existenz zweier paraloger SEC61-Gene und -Proteine nachweisen, sondern darüber hinaus zeigen, daß das zum Sec61p paraloge Ssh1p Bestandteil eines zweiten trimeren Komplexes ist, der neben dem bislang bekannten translokationsaktiven Sec61p-Komplex existiert. Die Komponenten dieses Ssh1p-Komplexes sind zu denen des Sec61p-Komplexes in unterschiedlichem Maße identisch: Die paralogen alpha-Untereinheiten, Sec61p und Ssh1p, mit ihren jeweils zehn prognostizierten membranspannenden Segmenten unterscheiden sich mit einer Identität von 30% bezogen auf die Gesamtlänge der Proteine deutlich voneinander, insbesondere wenn man

berücksichtigt, daß Sec61p in Hefe und Sec61 α p in Säugerzellen zu mehr als 50% identisch sind. Dagegen sind sich die beiden paralogen beta-Untereinheiten, Sbh1p und Sbh2p, mit etwa 50% Identität erheblich ähnlicher. Der Grad der Identität zum Säugerprotein Sec61 β p liegt für beide Proteine mit 30% (Sbh1p) bzw. 23% (Sbh2p) niedriger als der zwischen den beiden Hefeproteinen. Die jeweils dritte Untereinheit ist mit Sss1p für beide trimere Hefekomplexe gleich.

Die Analyse der beiden trimeren Komplexe durch Immunpräzipitation mit Antiseren gegen die einzelnen Komponenten zeigte, daß beide im wesentlichen als distinkte Komplexe in der Hefezelle vorliegen (Abb. 19). Selbst die sehr ähnlichen beta-Untereinheiten werden in der Regel nicht ausgetauscht. Sogar bei Fehlen einer beta-Untereinheit wird diese nicht durch das paraloge Protein ersetzt (Abb. 22), es sei denn, die zu dem verbleibenden beta-Protein gehörende alpha-Untereinheit wurde ebenfalls deletiert, wie in der Mutante Δ ssh1 Δ sbh1 geschehen (Abb. 23). Nur unter diesen artifiziellen Bedingungen konnte eine Assoziation der beta-Untereinheit des einen trimeren Komplexes, in diesem Fall Sbh2p, mit den Komponenten des paralogen trimeren Komplexes, hier Sec61p und Sss1p, nachgewiesen werden. Das Experiment zeigte, daß ein Austausch der beta-Untereinheiten prinzipiell möglich ist, jedoch normalerweise nicht oder nur unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode stattfindet. Die beiden trimeren Komplexe existieren somit in der Tat unabhängig voneinander in der Zelle.

Aus dem Vergleich des Ssh1p-Komplexes mit dem Sec61p-Komplex ergaben sich viele übereinstimmende Eigenschaften beider Komplexe und ihrer Komponenten, es fanden sich aber auch gravierende Unterschiede:

Wie der Sec61p-Komplex ist auch der Ssh1p-Komplex in der Membran des ER lokalisiert. Darauf weisen die Immunfluoreszenz-Untersuchungen, die eine Kolokalisation des Ssh1p mit dem ER-Markerprotein Kar2p zeigten (Abb. 9), ebenso hin wie das in beiden Komplexen vorkommende Protein Sss1p und die Austauschbarkeit der beta-Untereinheiten in der Mutante Δ ssh1 Δ sbh1 (Abb. 19, 20 und 23). Somit liegt nahe, eine dem Sec61p-Komplex vergleichbare Funktion des Ssh1p-Komplexes bei der Translokation von Proteinen durch die ER-Membran zu postulieren.

Im Unterschied zu Sec61p ist Ssh1p jedoch für die Hefezellen nicht essentiell, wenn es auch für normale Wachstumsraten erforderlich ist. Bei Zellen ohne Ssh1p-Komplex wurde eine verlängerte Verdopplungszeit im Vergleich zu Wildtyp-Zellen beobachtet. Deletion der beta-Untereinheit Sbh2p zeigte keinerlei Phänotyp. Das gleiche gilt allerdings auch für die Deletion der beta-Untereinheit des Sec61p-Komplexes, Sbh1p. Wurden dagegen sowohl Sbh1p als auch Sbh2p deletiert, ergaben sich deutliche Wachstumsdefekte bei erhöhten Temperaturen (Abb. 14), was dafür spricht, daß Sbh2p zur Translokationskapazität der Zelle beiträgt. Ähnlich zeigten Doppelmутanten, die zum einen ein temperatur-sensitives Allel des SEC61-Gens trugen (*sec61-2*) und in denen zum anderen das SSH1-Gen deletiert war, eine starke Beeinträchtigung des Wachstums bei Temperaturen, bei denen *sec61-2*-Zellen noch kaum betroffen sind (synthetisch letaler Phänotyp, Abb. 11). Da der Phänotyp der *sec61-2*-Mutante durch Degradation des Sec61-Proteins verursacht wird (Sommer und Jentsch, 1993; Esnault et al., 1994; Biederer et al., 1996), liegt die Erklärung nahe, daß der synthetisch letale Phänotyp dadurch zustande kommt, daß unter limitierenden Konzentrationen von Sec61p die Rolle des Ssh1p für die Zelle essentiell wird.

Diverse Deletionsmutanten wurden auf die Akkumulation von Präkursorproteinen *in vivo* untersucht. Weder für die Deletionsmutante Δ ssh1 noch für die Mutante Δ sbh2 konnte die Akkumulation eines der getesteten Substrate nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit denen von Ng et al. (1996), die im Δ ssh1-Stamm bei insgesamt neun untersuchten Präkursoren keinerlei Akkumulation fanden. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurden jedoch auch dort ausschließlich Substrate getestet, die bekanntermaßen Sec61-abhängig transportiert werden und somit keine Akkumulation nach Deletion des Ssh1p erwarten lassen.

Unerwartet war, daß auch bei Deletion der beta-Untereinheit des Sec61p-Komplexes, Sbh1p, keine Akkumulation von Kar2p und nur eine marginale Akkumulation von Präproalphafaktor (pp α F) beobachtet werden konnte. Lediglich für die Mutante, in der beide beta-Proteine, Sbh1p und Sbh2p, deletiert waren, ließ sich eine nennenswerte, wenn auch nicht starke Akkumulation von Präkursoren des alpha-Faktors und von Kar2p nachweisen. Diese Doppelmutante zeigte zudem in Untersuchungen auf Defekte bei der posttranslationalen Translokation *in vitro* eine 2-5fach reduzierte Transportrate im Vergleich zum Wildtyp (K. Plath, nicht gezeigt).

Vor allem die Untersuchungen der Doppelmutanten *sec61-2* Δ ssh1 und Δ sbh1 Δ sbh2 weisen somit auf eine Funktion des Ssh1p-Komplexes bei der Translokation von Proteinen über die ER-Membran hin. Der meist nur marginale Phänotyp der Einzelmutanten Δ ssh1, Δ sbh2 aber auch Δ sbh1 *in vivo* sowohl im Hinblick auf Wachstumsdefekte als auch auf die Akkumulation von Präkursoren mag auch ein Grund dafür sein, daß diese Komponenten in genetischen Screens auf Mutanten mit Translokationsdefekten nicht gefunden wurden.

Überdies spielt der Ssh1p-Komplex, obgleich er für normale Wachstumsraten benötigt wird, offenbar eine erheblich eingeschränkere Rolle bei der Translokation als der Sec61p-Komplex. Dies ist zunächst insofern unerwartet, als sich beide Komplexe in den Hefemikrosomen in annähernd gleichen Mengen nachweisen lassen, soweit es sich nach partieller Reinigung beider Komplexe in Coomassie-gefärbten Gelen abschätzen läßt (Steffen Panzner, persönl. Mitteilung und Abbildung 21a).

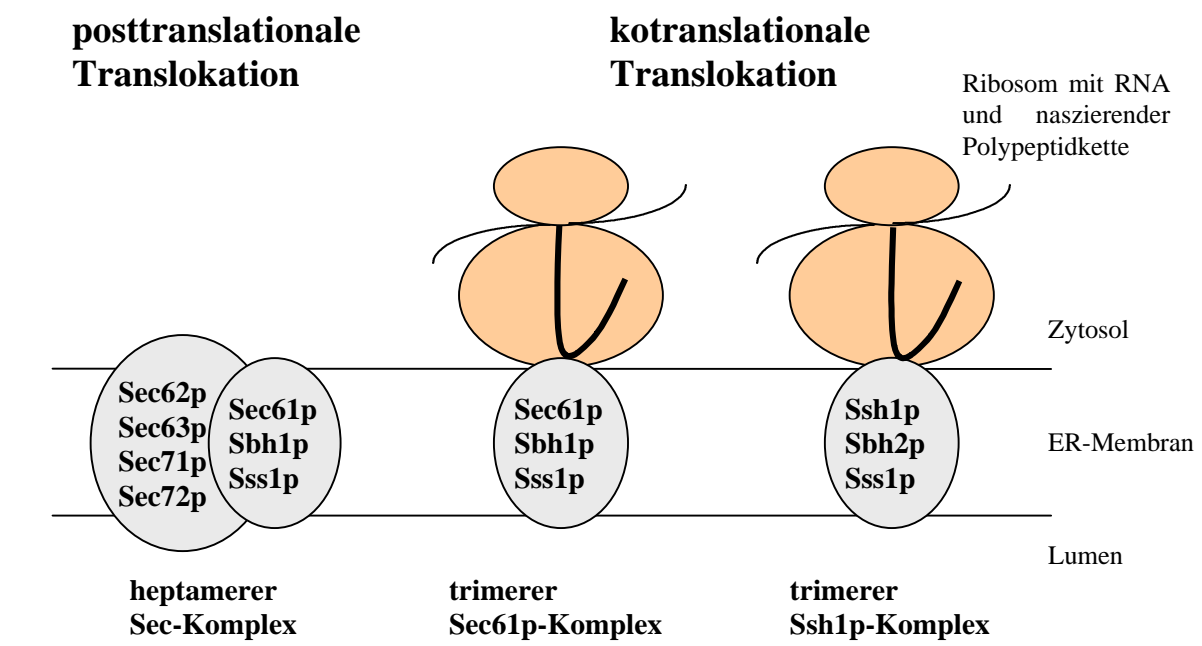
Ein weiterer gravierender Unterschied findet sich im Assoziationsvermögen beider Komplexe: Während ein Teil des Sec61p-Komplexes zusammen mit dem Sec62p/Sec63p-Komplex im heptameren Sec-Komplex assoziiert vorliegt, kann der Ssh1p-Komplex offenbar keine Verbindung mit dem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex eingehen, zumindest keine, die unter den gewählten Extraktions- und Immunpräzipitationsbedingungen stabil gewesen wäre (Abb. 19). Dies geschah auch nicht unter Bedingungen, unter denen Sec61p einer erhöhten Degradationsrate unterworfen ist, wie beispielsweise in der *sec61-2*-Mutante (Abb. 24). Der Grund dafür muß in Strukturunterschieden der alpha-Untereinheiten beider Komplexe, Sec61p und Ssh1p, liegen, da in der Doppeldelentionsmutante Δ sbh1 Δ sbh2 ebenfalls das unterschiedliche Assoziationsverhalten der beiden (in dem Fall dimeren) Komplexe beobachtet werden konnte und das Sbh2-Protein in der Mutante Δ ssh1 Δ sbh1 das Sbh1p auch im heptameren Komplex ersetzen konnte (Abb. 22 und 23).

Die Bedeutung des heptameren Sec-Komplexes für die Proteintranslokation der Hefezelle wird unter anderem dadurch belegt, daß mit Sec62p und Sec63p zwei weitere Proteine beteiligt sind, die durch essentielle Hefegene kodiert werden (Deshaies und Schekman, 1989; Sadler et al., 1989) und die sich zudem beide fast ausschließlich in diesem Komplex finden (Panzner et al., 1995). Da gezeigt werden konnte, daß nur der heptamere Sec-Komplex, nicht

aber der trimere Sec61p-Komplex die Fähigkeit zur posttranslationalen Translokation von Proteinen in rekonstituierte Proteoliposomen besitzt (Panzner et al., 1995), liegt die Vermutung nahe, daß der trimere Ssh1p-Komplex keine Rolle bei der posttranslationalen Translokation spielt.

Für eine Rolle des Ssh1p-Komplexes im kotranslationalen Transport dagegen spricht, daß ein Teil der Komplexe nach Solubilisierung von rauen Mikrosomen in Detergenz mit Ribosomen assoziiert vorgefunden wurde und von diesen durch Behandlung mit Puromycin unter hohen Salzkonzentrationen freigesetzt werden konnte (Abb. 25). Diese Eigenschaften sind auch von den Sec61-Komplexen in Hefe und Säugern bekannt (Görlich et al., 1992b; Panzner et al., 1995). Da gezeigt werden konnte, daß mit dem Sec61-Komplex in Säugern der kotranslationale Transport *in vitro* rekonstituiert werden kann (Görlich und Rapoport, 1993), liegt es nahe, die Hypothese aufzustellen, daß auch im Hefesystem die beiden trimeren Komplexe eine Funktion im kotranslationalen Transport erfüllen. Das würde einerseits erklären, warum Zellen, denen das Sbh2-Protein zusätzlich zum Sbh1-Protein fehlt, einen stärkeren Phänotyp zeigen als Zellen, in denen nur das SBH1-Gen deletiert ist. Zum anderen wäre verständlich, warum die Sequenzhomologien zwischen dem Sec61p und dem Ssh1p in erster Linie in den zytosolischen Bereichen beider Proteine zu finden sind, die vermutlich mit dem Ribosom interagieren müßten. Die luminalen Bereiche unterscheiden sich im Vergleich dazu stärker voneinander, was vermuten läßt, daß für den kotranslationalen Transport ein gemeinsamer Interaktionspartner im Lumen des ER nicht erforderlich ist. Der dargestellte Erklärungsansatz bleibt jedoch solange hypothetisch, bis der direkte Beweis dafür erbracht ist, daß der Sec61p- und der Ssh1p-Komplex tatsächlich eine Funktion im kotranslationalen Transport haben, beispielsweise durch die Etablierung eines rekonstituierten, SRP-abhängigen Translokationssystems in Hefe ähnlich dem für Säugerzellen.

Somit kann anhand der vorliegenden Daten folgende Modellvorstellung entworfen werden: Der Sec61p-Komplex hat demnach eine modulartige Funktion: zum einen als selbständige Einheit bei der kotranslationalen Translokation und zum anderen als Bestandteil des heptameren Sec-Komplexes bei der posttranslationalen Translokation von Proteinen durch die ER-Membran. Der Ssh1p-Komplex dagegen ist ausschließlich am kotranslationalen Transport beteiligt.



Welche Vorteile dieses zusätzliche kotranslationale Transportsystem allerdings der Hefezelle bietet, ist bislang unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die beiden Komplexe unterschiedliche Substrate transportieren. Das würde allerdings einerseits implizieren, daß der Ssh1p-Komplex ausschließlich Proteine transportiert, die für die Zelle nicht essentiell sind, oder daß die Unterscheidung nicht absolut strikt ist. Andererseits müßten dann auch zwei unterschiedliche „Targeting“-Systeme postuliert werden, die die entsprechenden Substrate entweder zu dem einen oder anderen Komplex dirigieren. Denkbar wäre dabei ein zweites SRP, auf das es jedoch bislang keinerlei Hinweise gibt, oder eine Unterscheidung der Substrate über die Signalsequenzerkennungsfunktion des trimeren Sec61p-Komplexes (Jungnickel und Rapoport, 1995), die der Ssh1p-Komplex möglicherweise ebenfalls besitzt.

Attraktiver ist vielleicht aber die Idee, daß ein zweiter Komplex, der ausschließlich in der kotranslationalen Translokation eine Rolle spielt, es der Zelle ermöglicht, kotranslationalen und posttranslationalen Transport unabhängig voneinander zu regulieren. Denn gäbe es den Ssh1p-Komplex nicht, würde zwangsläufig jede Änderung bezüglich des Sec61p-Komplexes zugleich den kotranslationalen wie auch den posttranslationalen Transport betreffen. Der Ssh1p-Komplex könnte somit dazu dienen, die kotranslationale Translokation unter Bedingungen zu verstärken, unter denen die posttranslationale Translokation konstant bleibt, oder umgekehrt die kotranslationale Translokation konstant zu halten, wenn die posttranslationale Translokation herauf- oder herabreguliert werden muß. Denkbar wäre natürlich auch eine Regulation des posttranslationalen Transports über den Sec62p/Sec63p-Komplex. Dessen Komponenten könnten jedoch zusätzlich Funktionen in anderen Bereichen wie beispielsweise der Karyogamie oder dem Import von Proteinen in den Kern haben (Kurihara und Silver, 1993; Ng und Walter, 1996), so daß ihre Regulierbarkeit nicht allein von Anforderungen der Translokation abhängig wäre.

4.3. Die Rolle der beta-Untereinheiten in der Translokation

Welche Funktion die beta-Untereinheiten der trimeren Komplexe ausüben, ist bislang nicht geklärt. Die vorliegenden Untersuchungen für *S. cerevisiae* zeigten, daß unter normalen Wachstumsbedingungen die beta-Untereinheiten weder für den kotranslationalen noch für den posttranslationalen Proteintransport absolut essentiell sind. Obgleich sich in der Doppeldeletionsmutante $\Delta sbh1 \Delta sbh2$ eine leichte Akkumulation von Präkursorproteinen nachweisen ließ und aus diesen Zellen isolierte Mikrosomen eine verlangsamte Translokationsrate *in vitro* im Vergleich zum Wildtyp zeigten, so war doch ein Wachstumsphänotyp erst unter erhöhten Temperaturen zu beobachten. Somit muß die dimere Einheit aus alpha- und gamma-Untereinheit sowohl für den Sec61p-Komplex als auch für den Ssh1p-Komplex funktionell sein. In der Tat ließen sich stabile dimere Komplexe aus Sec61p und Sss1p bzw. Ssh1p und Sss1p aus Deletionsmutanten einer oder beider beta-Untereinheiten isolieren.

Die Situation der beta-Untereinheiten in Hefezellen erinnert stark an die in *Escherichia coli*: auch dort ist die von der Größe her mittlere Untereinheit SecGp des zum Sec61p-Komplex homologen trimeren SecYEGp-Komplexes nicht essentiell (Nishiyama et al., 1993, 1994). SecYp und SecEp allein sind ausreichend für die Translokation von Proteinen in rekonstituierte Proteoliposomen, auch wenn die Reaktion durch Zugabe von SecGp stark

stimuliert wird (Akimaru et al., 1991; Nishiyama et al., 1993). Berücksichtigt man ferner, daß zwischen SecGp und Sbh1p oder Sbh2p keinerlei strukturelle Ähnlichkeit besteht, scheint es so, als würden die beta-Untereinheiten in beiden Fällen lediglich eine akzessorische Rolle bei der Translokation spielen.

Kürzlich konnten Kalies et al. (1998) im rekonstituierten *in vitro*-System zeigen, daß auch Sec61 β in Säugerzellen für die kotranslationale Translokation nicht essentiell ist, sie aber kinetisch erleichtert. Abwesenheit von Sec61 β verhindert nicht die eigentliche Translokation des Polypeptids, sondern führt zu Defekten in einem frühen Stadium des Translokationsprozesses. Dabei ist weder die Bindung des Komplexes aus Ribosom, naszierender Kette und SRP an die Translokationspore noch die Aufhebung des SRP-vermittelten Translationsarrestes bei fehlendem Sec61 β beeinträchtigt, sondern vermutlich die direkt darauf folgende Insertion der naszierenden Kette in den Translokationskanal. Für eine Funktion zu Beginn des Translokationsprozesses sprechen auch verschiedene Quervernetzungsexperimente. Laird und High (1997) konnten für die Insertion des multimembranspannenden Proteins Opsin abhängig von der Kettenlänge aufeinander folgende Quervernetzungen zu einem 21 kDa ribosomalen Protein, Sec61 β und schließlich Sec61 α nachweisen. Ähnliches gilt für die Membranintegration des Sec61 α selbst: Die naszierende Sec61 α -Polypeptidkette befindet sich in frühen Stadien der Translokation in unmittelbarer Nähe zu bereits membranständigem Sec61 α , Sec61 β und TRAM. Quervernetzungen des ersten Sec61 α -Transmembransegmentes zu Sec61 β und TRAM blieben während der Insertion von mindestens drei weiteren Transmembransegmenten nachweisbar (Knight und High, 1998).

Kalies et al. (1998) untersuchten darüberhinaus mittels chemischer Quervernetzung die unmittelbare Umgebung des Sec61 β . Dieses befindet sich nicht nur wie erwartet in direkter Nachbarschaft zu Sec61 α , sondern scheint auch spezifisch mit der 25 kD-Untereinheit des Signalpeptidase-Komplexes (SPC25) zu interagieren. Bemerkenswert ist, daß die Quervernetzungen sowohl zwischen Sec61 β und SPC25 als auch zwischen Sec61 β und Sec61 α von der Anwesenheit membrangebundener Ribosomen abhängig sind. Diese Daten lassen sich dahingehend interpretieren, daß die Initiation der kotranslationalen Translokation durch Bindung des Ribosoms mit der naszierenden Kette an die Membran zum einen zur Sec61 β -vermittelten Rekrutierung des Signalpeptidase-Komplexes an das aktive Translokon führt, zum anderen auch weitreichende strukturelle Veränderungen des Translokationskanals selbst bewirkt.

In diesem Licht läßt sich vielleicht auch das Vorhandensein des dimeren Komplexes aus Ssh1p und Sss1p ebenso wie das des trimeren Ssh1p-Komplexes mit dem N-terminal verkürzten Sbh2p in wt-Zellen von *S. cerevisiae* verstehen (vgl. Abb. 21B). Zwar läßt sich bislang nicht ausschließen, daß diese Varianten des Ssh1p-Komplexes lediglich Reinigungsartefakte darstellen, denkbar wäre aber auch, daß es sich hierbei um translokationsinaktive Formen oder aber um Auf- und Abbaustadien des Ssh1p-Komplexes handelt. In diesem Fall müßte jedoch gefragt werden, warum ähnliche Formen für den trimeren Sec61p-Komplex in wt-Zellen nicht nachweisbar sind.

Dies ist möglicherweise auf einige grundlegende Unterschiede, die trotz der relativ hohen Sequenzhomologie zwischen den beiden beta-Untereinheiten in *S. cerevisiae* bestehen, zurückzuführen. Einen wesentlichen Unterschied zeigten die vorliegenden Untersuchungsergebnisse beispielsweise bezüglich der Stabilität von Sbh1p und Sbh2p. So scheint Sbh1p in

der ts-Mutante sec61-2 unbeeinflusst von der verstärkten Degradation des Sec61p sowie des Sss1p als einzige Komponente des trimeren Sec61p-Komplexes stabil und überwiegend isoliert in der ER-Membran vorzuliegen (Abschnitt 3.2.3.4. und Biederer et al., 1996). Dagegen war in der Δ ssh1-Mutante der Gehalt an Sbh2p drastisch reduziert. Nimmt man allerdings an, daß die in wt-Zellen nachgewiesene N-terminal verkürzte Form des Sbh2p eine Degradationsform des Proteins darstellt, so muß in Betracht gezogen werden, daß in den Δ ssh1-Zellen ein mehr oder weniger großer Teil des Sbh2p in dieser verkürzten Form vorliegen und damit von dem gegen den äußersten N-Terminus gerichteten Antikörper nicht mehr detektiert werden könnte.

Offenbar ist jedoch das Sbh2-Protein in voller Länge ohne Assoziationspartner instabil. Die Mutante Δ ssh1 Δ sbh1 zeigte, daß Sbh2p mit Sec61p assoziieren kann, wenn beiden der ursprüngliche Partner fehlt. In dieser Mutante war der Gehalt an Sbh2p (in voller Länge) dem in wt-Zellen vergleichbar und nicht wie in der Einzelmutterante Δ ssh1 stark reduziert. So erklärt sich auch, warum die Doppelmutante Δ ssh1 Δ sbh1 nicht wie die Mutante Δ sbh1 Δ sbh2 einen temperatur-sensitiven Phänotyp zeigte. Sbh2p kann also offenbar durch Assoziation mit der einen oder anderen alpha-Untereinheit stabilisiert werden. Dies deutet darauf hin, daß die beiden paralogen beta-Untereinheiten prinzipiell austauschbar und ihre Funktionen bezüglich der Proteintranslokation durch die ER-Membran vermutlich überwiegend identisch sind.

Möglicherweise hat das Sbh1p, das offenbar auch außerhalb des trimeren Sec61p-Komplexes stabil in der ER-Membran vorliegen kann, weitere Funktionen, die nicht in direktem Zusammenhang mit dem Transport von Proteinen durch die ER-Membran stehen. Das SBH1-Gen wurde von Toikkanen et al. (1996) – unter der Bezeichnung SEB1 – als ein Suppressor der *sec15-1*-Mutation isoliert. Sec15p ist Bestandteil des sog. „Exocyst“-Komplexes, der eine Funktion im letzten Schritt des Sekretionsweges, der Exozytose, hat (TerBush et al., 1996). Aufgrund der nachgewiesenen ER-Lokalisation des Sbh1p/Seb1p (auch bei Überexpression) und seiner bekannten Funktion als Komponente des trimeren Sec61p-Komplexes erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die Suppression der *sec15-1*-Mutation auf einem indirekten Effekt beruht. Direktere Interaktionen zwischen SEC15 und SBH1/SEB1 wurden jedoch nicht ausgeschlossen (Toikkanen et al., 1996). Bislang fanden sich allerdings keine Hinweise, die diese Annahme stützen würden.

Künftigen Untersuchungen der beta-Untereinheiten in *S. cerevisiae* bleibt es vorbehalten zu überprüfen, ob auch die Überexpression des SBH2-Gens einen ähnlichen Suppressionseffekt auf die *sec15-1*-Mutation ausübt wie die des SBH1-Gens, oder ob sich hier ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Proteinen findet. Ein weiteres Ziel sollte die Gewinnung eines zusätzlichen Antiserums sein, das auch die N-terminal verkürzte Form des Sbh2p erkennt. Damit ließe sich der mögliche Abbau des Proteins über verschiedene Zwischenstufen besser verfolgen. Unabhängig davon sollte der heptamere Sec-Komplex aus Zellen der Doppeldeletionsmutante Δ ssh1 Δ sbh1, in dem Sbh2p das fehlende Sbh1p ersetzt, gereinigt und im rekonstituierten posttranslationalen Translokationssystem *in vitro* auf Funktionalität getestet werden. Dies würde möglicherweise Rückschlüsse auf weitere Übereinstimmungen und Unterschiede zwischen den beiden Proteinen erlauben. Die Etablierung eines kotranslationalen *in vitro*-Translokationssystems in Hefe ähnlich dem in Säugerzellen schließlich würde die Untersuchung des Ssh1p-Komplexes in allen seinen Varianten, gerade auch in Hinblick auf die beta-Untereinheit Sbh2p, erheblich erleichtern.

5. Material und Methoden

5.1. Allgemeine Methoden

Molekularbiologische Methoden und genetische Experimente wurden wie bei Ausubel et al. (1992) beschrieben durchgeführt. DNA-Plasmid-Präparationen erfolgten mittels alkalischer Lyse als „Mini-“, „Midi-“ oder „Maxipräp“ aus 3 ml, 150 ml bzw. 500 ml über Nacht gewachsener Bakterienkultur, die beiden letzteren mit Hilfe der entsprechenden Qiagen-DNA-Isolierungskits (Diagen) nach Anleitung des Herstellers. Die Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen ist unter 5.3.4. beschrieben. Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „GeneClean^R“-Kits (Bio-101) oder des „Qiaex DNA Gel Extraction“-Kits (Diagen), jeweils gemäß den Instruktionen des Herstellers. Restriktionsenzyme, Ligasen, Alkalische Phosphatase, RNase, Polynukleotidkinase u.ä. wurden in der Regel von den Firmen New England Biolabs, Promega oder Boehringer bezogen. PCR-DNA-Polymerasen (Taq-Polymerasen) stammten entweder von der Fa. Perkin Elmer Cetus, von Amersham oder von Roche, Pfu-DNA-Polymerase (rekombinant) wurde von Stratagene, dNTPs von Pharmacia bezogen. DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des „Sequenase“-Kits (USB) oder aber mit dem „fmol“-PCR-Sequenzierungskit (Promega), jeweils nach Anleitung des Herstellers. Transformation von DNA in Bakterien erfolgte in der Regel durch Elektroporation (Elektroporationsgerät und -küvetten der Fa. Biorad), in einigen Fällen durch Hitzeschock transformationskompetenter Zellen. Die Transformation von Hefezellen ist unter 5.3.3. beschrieben.

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten vorhandenen oder neu-konstruierten Plasmide, Vektoren, Bakterien- und Hefestämme findet sich im Anhang unter 6.1. Verwendete Zelllinien sind in den Abschnitten 5.2.1. sowie 5.5.3. aufgeführt.

5.2. Methoden für die RT-PCR-Analyse der beiden SEC61a-Gene in Säugerzellen

5.2.1. Ausgangsmaterial für die Gewinnung von RNA für die RT-PCRs

Für die RT-PCR-Analysen wurde RNA aus diversen Organen (Hirn, Herz, Niere, Leber und Milz) jeweils dreier adulter Mäuse gewonnen, zudem aus der stark vergrößerten Milz einer Maus mit einem Lymphom. Da bereits erste Experimente eine erhöhte Expression des SEC61 α -II-Gens im Hirn gegenüber den anderen Organen zeigte, wurden einige Hirnareale für die RNA-Gewinnung aus 42 Tage alten Mäusen präpariert (der Bulbus, Teile des Großhirns, das Cerebellum und das „Rest-Hirn“). Jeweils 1 μ g polyA⁺-RNA aus acht Embryonalstadien der Maus (Tag 8,5 bis Tag 15,5) wurde freundlicherweise von F. Schubert (Arbeitsgruppe Prof. P. Gruss, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurde RNA aus zwei Primärkulturen gewonnen: aus einer 8 Wochen alten Astrozytenkultur aus Ratte (kultiviert von Dr. M. O. Kristian Enkvist, Arbeitsgruppe Prof. Kettenmann, MDC Berlin)

und aus Hippocampus-Neuronen (ein Zelllysate wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. T. Futerman, Rehovot, Israel). Ebenso wurde RNA aus einigen Zelllinien präpariert: aus zwei Neuroblastom-Zelllinien (NG 108-15 (Maus-Neuroblastom-Ratten-Gliom-Hybridzellen (Hamprecht), Passage 20) und Neuro2a (Maus-Neuroblastom-Zelllinie)), aus beiden jeweils einmal im undifferenzierten und einmal im differenzierten Zustand (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Beckmann, Arbeitsgruppe Prof. Hucho, FU Berlin); weiterhin aus zwei Karzinom-Zelllinien: HT29 (Colon-Karzinom-Zelllinie) und LCLC (Large cell lung carcinoma-Zelllinie) (freundlicherweise von Dr. L. H. Finke, MDC Berlin, zur Verfügung gestellt).

5.2.2. Isolierung von RNA

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Isolierung von RNA wurden unter folgenden Vorsichtsmaßnahmen ausgeführt, um eine Kontamination von Proben mit ubiquitär vorkommenden RNasen zu verhindern:

Es wurden ausschließlich sterile Materialien (wie z.B. Gefäße, Pipetten, Pipettenspitzen etc.) und Lösungen benutzt. Alle Lösungen einschließlich dH₂O wurden vor dem Autoklavieren 30 min bei 37°C mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, das ein starker RNase-Inhibitor ist.

Die Isolierung von RNA geschah nach der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Methode mit Guanidinium-Thiocyanat und Extraktion mit H₂O-gesättigtem Phenol:

Die Mausorgane wurden sofort nach Entnahme aus den Tieren kurz in Puffer (50 mM Hepes pH 7,4, 250 mM Saccharose) gespült und in Aluminiumfolie gewickelt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Zellaufschluß erfolgte unter flüssigem Stickstoff zunächst mechanisch mit Hilfe eines Mörsers und Pistills (beide zuvor gründlich gereinigt, mit DEPC-dH₂O gespült und mit flüssigem Stickstoff heruntergekühlt). Das Pulver wurde anschließend mit 5 ml Lysispuffer (4 M Guanidinium-Thiocyanat; 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5 % Sarcosyl; 0,1 M 2-Mercaptoethanol) in einem zweiten Mörser lysiert. Zellen aus Kulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend ebenfalls durch Zugabe von 5 ml Lysispuffer lysiert. Der schleimige Zellextrakt wurde abgelöst und durch mehrfaches Aufziehen durch eine Injektionskanüle homogenisiert. Nacheinander wurden 0,5 ml 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 5 ml H₂O-gesättigtes Phenol und 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt und kräftig gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde 30 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert und die RNA-enthaltende wässrige Phase mit 1 Vol. Isopropanol 1 h bei -20°C gefällt. Die präzipitierte RNA wurde 30 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet je nach Größe in 0,5 bis 4 ml dH₂O gelöst. Es folgte eine zweite Phenol/Chloroform-Extraktion mit 1 Vol. H₂O-gesättigtem Phenol und 0,25 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol; zentrifugiert wurde je nach Volumen 3 min bei 14.000 rpm oder 30 min bei 4.000 rpm. Aus der wässrigen Phase wurde die RNA mit 1 Vol. 5 M Ammoniumacetat und 2,2 Vol. Ethanol 1 h bei -20°C gefällt; anschließend wurde 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde einmal mit 80 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich je nach Pelletgröße in 150 bis 600 µl dH₂O gelöst. Die Menge der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt, indem ein Aliquot 1:100 verdünnt und die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) gemessen wurde (OD₂₆₀ = 1 entspricht 40 µg RNA/ml). Die Konzentration der Lösungen wurde auf 1 µg/µl eingestellt. Die Lagerung erfolgte für einige Tage bei -20°C, für mehrere Wochen bei -70°C.

5.2.3. Reverse Transkription (RT)

Pro RT-Ansatz wurden 200 ng RNA mit 100 ng Hexanukleotiden in einem Volumen von 7,5 µl für 10 min bei 67°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. 12,5 µl eines Reaktionsmixes, der pro Ansatz 4 µl 5x-RTase-Puffer (Gibco), 2 µl 100 mM DTT (Gibco), 5 µl 5 mM dNTPs, 0,5 µl RNasin (Promega) und 1 µl Superscript MoMLV-RTase (Gibco) enthielt, wurden hinzugesetzt und die Ansätze für 1 h bei 42°C inkubiert. Für die Kontrollansätze enthielt der Reaktionsmix statt der RTase dH₂O.

5.2.4. PCR

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide (vgl. Abschnitt 5.2.5.) wurden als Lyophilisat von der BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen und grundsätzlich mit einer Konzentration von 100 OD_{260nm}/ml in dH₂O gelöst. Aus dieser Stocklösung wurde eine 1:100-Verdünnung in dH₂O hergestellt, so daß sich für die Gebrauchslösung eine Konzentration von 1 OD_{260nm}/ml ergab. Ein Standardansatz für die PCR mit einem Endvolumen von 25 µl enthielt 2 µl des RT-Ansatzes, 13 µl dH₂O, je 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 5'Primer (1 OD_{260nm}/ml), 3'Primer (1 OD_{260nm}/ml) und 5 mM dNTPs sowie 0,35 µl Taq-Polymerase (Amersham). Soweit als möglich wurden Reaktionsmische aus gemeinsamen Komponenten für die verschiedenen Ansätze hergestellt, um das Pipettieren kleiner Volumina zu vermeiden und möglichst vergleichbare Reaktionsbedingungen zu garantieren. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt programmiert: Auf eine anfängliche Denaturierung für 1 min bei 95°C folgten 30 Zyklen: 30 s Denaturierung bei 95°C - 30 s Annealing (Temperatur abhängig von den eingesetzten Primern) - 2 min Elongation bei 72°C. Abschließend wurde für weitere 5 min bei 72 °C inkubiert, bevor die Ansätze auf 4°C heruntergekühlt wurden. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der niedrigsten Schmelztemperatur der jeweils verwendeten Primer gewählt, die sich aus der Zusammensetzung ihrer Nukleotide ergibt. Die Schmelztemperatur wurde gemäß folgender Formel berechnet: für jeden Cytosin- und Guaninrest wurden 4°C, für jeden Adenin- und Thyminrest 2°C berechnet und die Summe aus allen Resten des Oligonukleotids gebildet (Wallace et al., 1979; Formel nicht gültig für lange Oligonukleotide). Bei den verwendeten Primern wurden in der Regel Annealingtemperaturen zwischen 58°C und 72 °C gewählt.

10 µl-Aliquots der Ansätze wurden zur Analyse der PCR-Produkte auf 1%-Agarose-Gele aufgetragen.

5.2.5. Primerkombinationen für RT-PCR-Experimente

Die folgende Übersicht stellt die durch RT-PCR amplifizierte cDNA-Fragmente schematisch dar unter Angabe der jeweils verwendeten Primerkombinationen. Die Kontrollen auf Typspezifität der einzelnen Primer sind ebenfalls gezeigt. Diese ergaben für keinen der eingesetzten Primer ein PCR-Produkt. Tabellarisch aufgeführt sind im Anschluß daran die Sequenzen der für die RT-PCR-Experimente verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der beiden SEC61α-Gene, ihre Orientierung (S, sense oder AS, antisense) und jeweilige Position im Gen sowie ihre Speziespezifität: HS-1 und -2 bezeichnen die beiden menschlichen Gene (*Homo sapiens*), RN-1 und -2 die aus Ratte (*Rattus norvegicus*), MM-1 und -2 die aus Maus (*Mus musculus*) und CF-1 und -2 die aus Hund (*Canis familiaris*).

Übersicht Primerkombinationen für RT-PCRs



TypI-spez.:

553/554	→	RN-1 ~ RN-1
759/757	←	RN-1/MM-1 ~ RN-1/MM-1
904/554	→	RN-1 ~ RN-1
904/1178	→	RN-1 ~ RN-1+2/MM-1+2
904/757	→	RN-1 ~ RN-1/MM-1
904/1179	→	RN-1 ~ HS-1
1181/1179	→	HS-1/MM-1 ~ HS-1
1181/757	→	HS-1/MM-1 ~ RN-1/MM-1

TypII-spez.:

439/456	→	HS-,RN-,MM-+CF-2 ~ HS-2
760/758	←	RN-2/MM-2 ~ RN-2/MM-2
439/758	→	alle*-2 ~ RN-2/MM-2
1069/1178	→	HS-2/CF-2 ~ RN-1+2/MM-1+2
1069/758	→	HS-2/CF-2 ~ RN-2/MM-2
1069/1180	→	HS-2/CF2 ~ HS-2
1182/758	→	MM-2 ~ RN-2/MM-2
1183/758	→	HS-2 ~ RN-2/MM-2
1183/1180	→	HS-2 ~ HS-2

Kontrollen

Typspezifität:

439/554	→	HS-,RN-,MM-+CF-2 ~ RN-1
553/456	→	RN-1 ~ HS-2
1181/1180	→	HS-1/MM-1 ~ HS-2
1183/1179	→	HS-2 ~ HS-1
1181/758	→	HS-1/MM-1 ~ RN-2/MM-2
1182/757	→	MM-2 ~ RN-1/MM-1
1069/757	→	HS-2/CF-2 ~ RN-1/MM-1

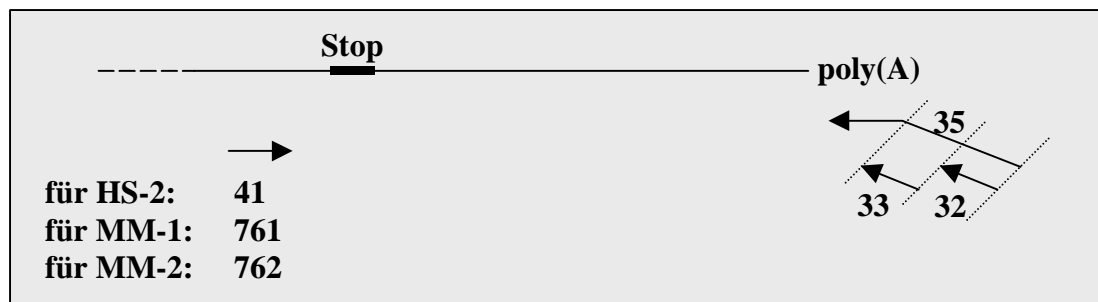
Bezeichnung	Orientierung	Sequenz	Pos. im Gen (ATG =1,2,3)	Speziesspezifität
439-22	S	5'-ATGATCATTACCATTGGGCAAG-3'	361-382	HS-2, RN-2, MM-2, CF-2
456-30	AS	5'-ACTGACATCGGCCACTGTCCTAGTA AATT-3'	984-955	HS-2
553-22	S	5'-ATGATCATCACTATCGGTCAGT-3'	361-382	RN-1
554-30	AS	5'-ATGACGTATCCGACCAGGTGCCCAGC AGGC-3'	985-956	RN-1
757-21	AS	5'-TCCCATGCTGCCACCTCGCT-3'	1416-1396	RN-1 und MM-1
758-21	AS	5'-ACCCATTCCACCAACTTCAGC-3'	1416-1396	RN-2 und MM-2
759-19	S	5'-CCGAGTGGACCTTCCAATC-3'	783-801	RN-1 und MM-1
760-19	S	5'-TCGTGTTGACTTGCCATT-3'	783-801	RN-2 und MM-2
904-25	S	5'-GAAGTCATCAAGCCATTCTGTGTCA-3'	19-43	RN-1
1069-21	S	5'-GCCATGGGCATCAAATTTT-3'	-3 -18	CF-2 und HS-2
1178-19	AS	5'-GTCCCCGTACAT(G/C)CCCGTC-3'	416-399	RN-1, MM-1, RN-2 und MM-2
1179-21	AS	5'-CCCCATGCTGCCAACCTCGCT-3'	1416-1396	HS-1
1180-19	AS	5'-ACCCATCCACCAACTTCGGC-3'	1416-1396	HS-2
1181-20	S	5'-TGCCGGAATTCAGAAGCCA-3'	47-66	HS-1 und MM-1
1182-21	S	5'-CTACCAGAAATTCAGAAAGCCT-3'	46-66	MM-2
1183-21	S	5'-CTACCAGAAATTCAGAAACCG-3'	46-66	HS-2

Für die Amplifikation des HPRT-Gens, das als Referenzgen zum Vergleich der RNA-Mengen unterschiedlicher Präparationen eingesetzt wurde, wurden folgende Maus-spezifische Primer eingesetzt:

825-19 5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3' (sense)
824-20 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3' (antisense)

5.2.6. 3'-race

Die 3'-Enden der Gene SEC61 α -I aus Maus und SEC61 α -II aus Maus und Mensch wurden durch die Methode des 3'-race (rapid amplification of cDNA ends) amplifiziert. Dabei macht man sich das Vorhandensein eines poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende jeder mRNA zunutze. Für die reverse Transkription der RNA wird ein langes Oligonukleotid (hier: Primer 35) benutzt, dessen 3'-Abschnitt aus oligo(dT) und dessen 5'-Abschnitt aus einer selbstgewählten Sequenz besteht. Die aus dieser Reaktion resultierende cDNA wird als Template für die anschließende PCR gewählt, bei der der 3'-Primer mit dem 5'-Abschnitt des für die reverse Transkription eingesetzten Oligonukleotids überlappt (hier: Primer 32 oder 33) und der 5'-Primer aus der bekannten Sequenz des Zielgens stammt. Die nachfolgende schematische Darstellung verdeutlicht die Position der Primer bezüglich des Zielgens.



Übersicht über die für die 3'-race verwendeten Oligonukleotide:

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz	Position im Gen (ATG = 1,2,3)	Speziesspezifität
35-57	AS	5'-GTACGTCGTGCCGTACGACGGAACGTGTACGGCCGCTCTGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	poly(A)-Schwanz	jede mRNA
32-30	AS	5'-GTACGTCGTGCCGTACGACG-3'	überlappend mit dem 5'-Abschnitt von Primer 35	
33-20	AS	5'-GAACGTGTACGGCCGCTCTG-3'		
41-20	S	5'-TGGG(A/C)GCCAT(A/C)TTTGAGGAT-3'	1052 - 1071	HS-2, RN-2, CF-2, MM-2
761-22	S	5'-TATCGGGTCTGGCACCGGGATC-3'	1320-1341	RN-1
762-25	S	5'-CGCCATTGGCTCGGGCACTGGAATT-3'	1317-1341	RN-2

Reverse Transkription und PCR wurden wie in den Abschnitten 5.2.3. und 5.2.4. beschrieben durchgeführt.

5.3. Methoden beim Arbeiten mit *S. cerevisiae*

5.3.1. Wachstumsbedingungen und verwendete Medien

Die Wachstumstemperatur für die Hefestämme betrug, falls nicht anders genannt, 30°C. Die Inkubation erfolgte entweder in Flüssigmedien im Schüttelwasserbad oder auf festen Medien (Agarplatten) im Brutschrank.

Verwendete Medien:

Vollmedium YP: 1% Bacto-Yeast-Extract (Difco)
2% Bacto-Peptide (Difco)
vor Gebrauch Zugabe der sterilfiltrierten Kohlenstoffquelle:
YPD: 2% Glucose (Endkonz.)
YPGal: 2% Galaktose (Endkonz.)
YPS: 2% Saccharose (Endkonz.)
YPG: 3% Glycerin (Endkonz.)

Minimalmedium SD: 0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco) ohne Aminosäuren
2% Glucose

Sgal: 0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco) ohne Aminosäuren
2% Galaktose

Supplemente für Minimalmedien:

Supplement	Endkonzentration	Stammlösung (Lagerung)	Zusammensetzung des Supplement-Mixes
Adeninsulfat	20 mg/l	2 mg/l (Raumtemp., dunkel)	50 ml
Uracil	20 mg/l	2 mg/l (Raumtemp., dunkel)	50 ml
L-Tryptophan	20 mg/l	10 mg/l (-20°C)	10 ml
L-Histidin-HCl	20 mg/l	10 mg/l (4°C)	10 ml
L-Leucin	30 mg/l	10 mg/l (4°C)	15 ml
L-Lysin	30 mg/l	10 mg/l (4°C)	15 ml

Für Stämme ohne Selektionsmarker wurde bei Verwendung von Minimalmedium der komplette Supplement-Mix (3 ml Mix/100 ml Medium) zugesetzt. Für Selektionsmedien wurden einzelne Supplemente im Mix durch dH₂O ersetzt.

Feste Medien (für Agarplatten) enthielten außer den Bestandteilen der Flüssigmedien 2% Agar.

YP-Medium (gegebenenfalls mit Agar) sowie Agar in dH₂O für Minimalplatten wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Die Minimalmedien, die Supplement-Mixe, die 20%igen Stocklösungen der Kohlenstoffquellen sowie 10 x YNB (6,7%) wurden sterilfiltriert.

5.3.2. Kreuzung, Sporulation und Tetradenanalyse

5.3.2.1. Kreuzung von Hefestämmen

Die Kreuzung eines haploiden Stammes des Paarungstyps α mit einem des Paarungstyps a geschah durch Mischen eines Aliquots jedes Stammes (z.B. jeweils 5 μ l einer Flüssigkultur) auf einer Vollmedium-Agarplatte und Inkubation bei 30°C für 6 - 8 h. Wenn möglich waren die Stämme auf unterschiedliche Marker selektionierbar, so daß durch anschließendes Ausstreichen auf Selektionsplatten Kolonien aus diploiden Zellen identifiziert werden konnten. Andernfalls wurden Zellen einzelner Kolonien (auf SPO-Agarplatten, vgl. 5.3.2.2.) auf ihre Sporulationsfähigkeit und damit Diploidie getestet (letzteres ist nicht möglich, wenn die diploiden Stämme sporulationsdefizient sein sollten (z. B. pep4-Homozygote)).

5.3.2.2. Sporulation

Die diploiden Hefen wurden für 6 - 8 h bei 30°C in Präsporulationsmedium (PSPO) inkubiert. (Bei der Temperaturwahl ist zu beachten, daß ab 34°C keine Sporulation mehr stattfindet !) Anschließend wurden die Zellen bei 5.000 rpm für 2 min zentrifugiert und einmal in Sporulationsmedium (SPO) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml SPO-Medium, das 1/4 der entsprechenden normalen Supplementkonzentration (7,5 μ l) enthielt, resuspendiert. Die Sporulation erfolgte bei 30°C für etwa 2 Tage (längere Inkubation führt zu mehr keimungsunfähigen Sporen). Die Sporulation wurde im Mikroskop überprüft - optimal ist eine Sporulationsrate von 80 - 90 %. Die sporulierten Zellen wurden abzentrifugiert und in 1 ml SED (1 M Sorbit, 25 mM EDTA) aufgenommen. Bei 4°C sind die Sporen für mehrere Tage haltbar.

PSPO-Medium: 0,8 % Bacto-Yeast-Extract
 0,3 % Bacto-Peptide
 10 % Glucose

SPO-Medium: 1 % Kaliumacetat
 0,1 % Bacto-Yeast-Extract
 0,05 % Glucose

Beide Medien wurden sterilfiltriert.

5.3.2.3. Tetradenanalyse

Für die Tetradenanalyse wurden die sporulierten Zellen protoplastiert: 200 μ l sporulierte Hefezellen wurden mit 10 μ l 1 M DTT und 20 μ l Novozym (10 mg/ml) vermischt und für etwa 15 min (gegebenenfalls auch länger) bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Aliquot wurde auf einer Platte zur Tetradenanalyse (Vollmedium) ausgestrichen und die vier Sporen einzelner Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators (MSM, Fa. Singer) getrennt. Die Analyse der Tetraden erfolgte anhand der Phänotypen bzw. der entsprechenden Selektionsmarker.

5.3.3. Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA

Zum Transformieren von Hefezellen wurden entweder ARS/CEN-Plasmide (Single-Copy-Plasmide, 1 Plasmid pro Zelle) oder 2 μ -Plasmide (Multi-Copy-Plasmide, ca. 50 Plasmide pro Zelle) eingesetzt. Die Selektion der Transformanten erfolgte über Selektionsmarkergene wie LEU2, HIS3 oder ADE2, die ein Wachstum in dem entsprechenden Selektionsmedium (vgl. 5.3.1.) ermöglichten. Für die Transformation wurden aus über Nacht gewachsenen Vorkulturen Hauptkulturen in Vollmedium YPD mit einer OD_{600nm} von 0,2 - 0,3 pro ml Kultur angeimpft und bei 30°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Bei einer OD_{600nm} von 0,8 - 1,2 wurden pro Transformationsansatz eine 10 OD_{600nm} entsprechenden Menge der exponentiell wachsenden Zellen durch Zentrifugation bei Raumtemperatur und 2.000 rpm für 2 min geerntet, einmal mit dH₂O und einmal mit 0,1 M LiAc/TE gewaschen und anschließend in 200 μ l 0,1 M LiAc/TE pro Transformationsansatz resuspendiert. Diese 200 μ l Zellen wurden in der Regel mit 7 μ l der zu transformierenden Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l) und 15 μ l Heringssperm-DNA (3 mg/ml), die zuvor hitzedenaturiert worden war (Inkubation bei 68°C für 10 min, dann auf Eis), vermischt und mit 500 μ l 0,1 M LiAc/TE/40% PEG versetzt und durchmischt. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für 30 min und bei 42°C für 15 min. Anschließend wurden die Ansätze für 3 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 500 μ l SD-Medium resuspendiert. Davon wurden 100 μ l auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

TE:

10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA pH 8,0
(Stocklösung: 10x TE)

PEG:

20 % PEG 4000 oder 6000
10 mM CaCl₂
10 mM Tris pH 7,5

5.3.4. Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen

Genomische DNA wurde aus 10 ml dicht gewachsener Hefe-Kultur isoliert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 3.000 rpm), einmal mit 0,5 ml SED (1 M Sorbit, 25 mM EDTA) gewaschen, erneut pelletiert (2 min, 5.000 rpm) und in 0,5 ml SED/25 μ l 1 M DTT/50 μ l Novozym (10 mg/ml in SED/50 mM DTT) vorsichtig resuspendiert. Zur Sphäroblastierung wurden die Zellen 40 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die leicht visköse Zellsuspension 1 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet auf 800 μ l mit 10x TE (100 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA pH 8,0) aufgefüllt und vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 50 μ l SDS folgte eine Inkubation bei 65°C für 20 min. Dabei wurde das Reaktionsgefäß hin und wieder vorsichtig invertiert. Nach Zugabe von 200 μ l 5 M Kaliumacetat und vorsichtiger Durchmischung wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Abtrennung des Pellets noch einmal wie zuvor zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 100% Ethanol ausgefällt, für 10 s pelletiert, 5 min in der SpeedVac getrocknet und in 300 μ l TE bei 65°C gelöst. Es folgte eine Behandlung mit 20 μ l RNase A für 30 min bei 65°C. Anschließend wurde der Ansatz mit 500 μ l eiskaltem Isopropanol überschichtet. An der Grenzschicht fällt die DNA aus. Diese kann entweder direkt aus dem Ansatz „gefischt“ werden, z.B. mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze oder durch kurzes Pelletieren eingesammelt werden. Die DNA wurde in 100 μ l dH₂O bei 65°C gelöst und bei -20°C gelagert.

5.4. Klonierung und Deletion der Gene SSH1, SBH1 und SBH2

5.4.1. Klonierung des SSH1-Gens

Der Klon für SSH1 wurde aus einer genomischen Bank von *S. cerevisiae* (die in den Vektor pSEY8 kloniert war) durch Hybridisierung mit dem folgenden Oligonukleotid isoliert: 5'-GCGCGTAGCAGAGAGAATTTGATC-3'. Die Sequenz dieses Oligonukleotids stimmt mit dem 5'-Ende des GenBank-Klons # S77888 überein. Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid mit dem SSH1-Gen aus der genomischen Bank trug die Bezeichnung pSEC61VII (später pSSH1). Noch während der Untersuchungen des SSH1-Komplexes wurde die Sequenz des SSH1-Gens durch Feldmann et al. (1994) im Rahmen des *S. cerevisiae*-Genom-Sequenzierungsprojektes veröffentlicht.

5.4.2. Deletion des SSH1-Gens

Es wurden drei verschiedene Deletionskonstrukte des SSH1-Gens mit unterschiedlichen Selektionsmarkern hergestellt. Dazu wurde zunächst ein 1756 bp NheI/SnaBI-Fragment aus pSEC61VII, das das SSH1-Gen samt seinem natürlichen Promotor enthielt, entweder in die XbaI/EcoRV-Schnittstelle des Vektors pBluescript, resultierend in pKF3, oder in die XbaI/SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC19, resultierend in pKF4, umklont. pKF3 war Ausgangspunkt für ein Deletionskonstrukt, in dem der größte Teil der kodierenden Region des SSH1-Gens (ein 1171 bp EcoRV/EcoRI-Fragment) durch das HIS3-Markergen (ein etwa 1,9 kb SmaI/EcoRI-Fragment aus dem Plasmid pUC-HIS) ersetzt wurde. Das resultierende Plasmid pKF5 ist somit durch Δ ssh1::HIS3 charakterisiert. Zwei weitere Deletionskonstrukte entstanden aus pKF4. Für Δ ssh1::LEU2 wurde ein 649 bp EcoRV/BglII-Fragment aus der kodierenden Region des SSH1-Gens durch das LEU2-Gen (ein etwa 2,2 kb BamHI/SmaI-Fragment aus dem Plasmid bsLEU) ersetzt, resultierend in pTX73. Für Δ ssh1::ADE2 schließlich wurde in die EcoRV-Schnittstelle von pKF4 ein BamHI-Linker eingeführt (resultierend in pKF6) und das 649 bp BamHI/BglII-Fragment aus der kodierenden Region des SSH1-Gens durch das ADE2-Gen (ein etwa 2,2 kb BglII-Fragment aus dem Plasmid pASZ11) ersetzt, resultierend in pKF7.

5.4.3. Klonierung des SBH1-Gens

Der Klon wurde aus derselben genomischen Bank isoliert wie der für SSH1. Für das „Screening“ der Bank wurde das Oligonukleotid 5'-ACTCTACCTCCTACCATACTCC-3' eingesetzt, dessen Sequenz mit der des 5'-untranslatierten Bereichs des GenBank-Klons # SCE9747 korrespondiert.

5.4.4. Deletion des SBH1-Gens

Zur Herstellung des Deletionskonstrukts Δ sbh1::HIS3 wurde ein 410 bp-Fragment der 5' flankierenden Region (5'FR, Nukleotide -387 bis +23, wobei die Position +1 das A des ATG-Startcodons bezeichnet) und ein 361 bp-Fragment der 3' flankierenden Region (3'FR, Nukleotide +224 bis +584) des SBH1-Gens durch PCR aus genomischer DNA amplifiziert.

Die dafür verwendeten, nachstehend aufgeführten Primer waren für Klonierungszwecke so gewählt, daß sie an den Enden der PCR-Fragmente Restriktionsschnittstellen einführen:

Ziel-fragment	Richtung d. Primers	Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz des Oligonukleotids und eingeführte Restriktionsschnittstelle
5'FR	sense	94-26	5'-GCTCTAGACCGCTGCCAAGCATAAAC-3' XbaI
5'FR	antisense	95-23	5'-CGGGATCCTGGAGGAGTTGGGCT-3' BamHI
3'FR	sense	154-27	5'-CGGGATCCTAAAGTTGCCGGTAAGTTA-3' BamHI
3'FR	antisense	97-26	5'-GGAATTCCATACTGTTCCAATCCAGC-3' EcoRI

Die in den Vektor pGEM-T klonierten PCR-Fragmente (das 5'FR-Fragment in pKF24, das 3'FR-Fragment in pKF25) wurden durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden beide Fragmente zusammen in den pBluescript-Vektor kloniert (pKF29) und in die BamHI-Schnittstelle zwischen den beiden Fragmenten das HIS3-Gen (ein ca. 1,7 kb BamHI-Fragment aus pUC-HIS) eingefügt, resultierend in pKF30.

5.4.5. Klonierung des SBH2-Gens

Das SBH2-Gen wurde gefunden durch „Screening“ der o.g. genomischen Hefebank mit einem degenerierten Oligonukleotid 5'-GA(AG)AA(AG)CA(AG)GCNAA(AG)CA(AG)AC-3', dessen Sequenz sich von der Peptidsequenz EKQAKQT ableitet, die durch Sequenzierung des Sbh2-Proteins bestimmt wurde. Die vollständige Nukleotidsequenz positiver Klone wurde bestimmt. Der nachfolgend verwendete Klon (11/87) aus der genomischen Hefebank wurde mit pS61β-II (später pSBH2) bezeichnet.

5.4.6. Deletion des SBH2-Gens

Die Deletionskonstrukte für das SBH2-Gen wurden in ähnlicher Weise wie das für das SBH1-Gen hergestellt. Das 5'FR-Fragment enthielt die Nukleotide -215 bis +17, das 3'FR-Fragment die Nukleotide +227 bis +637. Die verwendeten Oligonukleotide sind im folgenden aufgeführt:

Ziel-fragment	Richtung d. Primers	Bez.d.Oligo-nukleotids	Sequenz des Oligonukleotids und eingeführte Restriktionsschnittstelle
5'FR	sense	1763-25	5'-GCTCTAGAGCTGCCCCGGGTACCAC-3' XbaI
5'FR	antisense	1764-28	5'-CGGGATCCCGGAAGCTGCCATTC-3' BamHI
3'FR	sense	1765-29	5'-CGGGATCCCTTGCTTTGCATCTATTGACG-3' BamHI
3'FR	antisense	1766-26	5'-GGAATTCCAGAGATACTCCAACCTACG-3' EcoRI

Die in den Vektor pGEM-T klonierten Fragmente (das 5'FR-Fragment in pKF17, das 3'FR-Fragment in pKF18) wurden durch Sequenzierung überprüft und anschließend zusammen in den pBluescript-Vektor kloniert (pKF19). In die BamHI-Schnittstelle zwischen den beiden Fragmenten wurde entweder das ADE2-Gen (ein 2,2 kb BglII-Fragment aus pASZ11), resultierend in pKF20 mit $\Delta sbh2::ADE2$, oder das HIS3-Gen (ein ca. 1,7 kb BamHI-Fragment aus pUC-HIS), resultierend in pKF21 mit $\Delta sbh2::HIS3$, eingefügt.

5.4.7. Einbringen der Deletionskonstrukte in Hefezellen

Die Deletionskonstrukte wurden grundsätzlich zunächst in den diploiden wt-Stamm YTX69 transformiert. Anschließend ließ man die Zellen sporulieren und führte eine Tetradenanalyse durch (vgl. 5.3.2). Nachdem klar war, daß Deletion aller drei Gene nicht letal war, wurden auch haploide Zellen mit den Deletionskonstrukten transformiert. Doppel- oder Tripelmutanten entstanden entweder durch Transformation von Zellen, die bereits eine Deletion trugen, mit einem weiteren Deletionskonstrukt (z.B. YKF16 und YKF19), oder durch Kreuzung von Einzelmутanten und nachfolgender Sporulation und Tetradendisektion (z.B. YKF24). Die Doppelmutante YKF5, die ein *ts*-Allel des SEC61-Gens und eine Deletion im SSH1-Gen trägt, entstand durch Transformation des *sec61-2*-Stammes YFP338 mit dem $\Delta ssh1::ADE2$ -Deletionskonstrukt (in pKF7). Alle Deletionsstämme wurden durch Immunoblotting und in einigen Fällen auch durch Southern Blot Analyse verifiziert.

5.5. Immunfluoreszenz

5.5.1. Epitop-Tagging des SSH1-Gens

Das Ssh1-Protein wurde für die Detektion per Immunfluoreszenz mit einem Myc-Epitop am C-Terminus markiert. Dazu wurde durch stumme Mutagenese an Position 13 und 16 vor dem Stop-Codon eine KpnI-Restriktionsschnittstelle eingeführt: Aus dem Plasmid pSEC61VII wurde ein ca. 1,2 kb EcoRI-Fragment, das den C-terminalen Teil des SSH1-Gens enthält, ausgeschnitten und in den Mutagenese-Vektor pALTER (Promega) subkloniert, resultierend in dem Plasmid pKF11. Die Mutagenese wurde gemäß der Anleitung für das „Altered SitesTM *in vitro* Mutagenesis Systems“ (Promega) mit Hilfe des Mutagenese-Oligonukleotids 1097-28 (5'-CATAGCACCTGGTACCCCCAAGACTTGA-3') durchgeführt und ergab das Plasmid pKF12. Die erfolgreiche Mutagenese wurde per Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das 1,2 kb EcoRI-Fragment aus pSEC61VII durch das mutagenisierte EcoRI-Fragment aus pKF12 ersetzt, resultierend in pKF13. Die neu-eingeführte KpnI-Schnittstelle wurde nun für die Insertion eines Linkers aus zwei Oligonukleotiden (s.u.), der für das Myc-Epitop kodierte, genutzt. Ein Klon mit fehlerfreier Insertion in korrekter Orientierung wurde durch Sequenzierung ermittelt. Das entstandene Plasmid pKF14 enthielt das SSH1-Gen mit C-terminalem Myc-Epitop unter seinem natürlichen Promotor in einem 2 μ m-Plasmid. Subklonierung des ca. 2,5 kb SmaI/SalI-Fragments aus pKF14 in den ARS/CEN-Vektor pRS414 (Sikorski und Hieter, 1989) führte zu dem Plasmid pKF15 (mit gleichem Insert wie pKF14), das jedoch als ARS/CEN-Plasmid in Hefezellen in einfacher Kopie vorliegt, während

pKF14 als (2µm-)Multicopy-Plasmid in einer Kopienanzahl von etwa 50 pro Zelle vorkommt. Beide Plasmide wurden erfolgreich für die Immunfluoreszenz eingesetzt.

Richtung d. Primers	Bezeichnung d. Oligonukleotids	Sequenz der Oligonukleotide für den Myc-Epitop-Linker
sense	1098-54	5'-CAGGTGCTATGGAACAAAAGTTGATCTCTGAAGA AGACTTGTAAGCATGCGTAC-3'
antisense	1099-54	5'-GCATGCTTACAAGTCTTCTTCAGAGATCAACTTTT GTTCCATAGCACCTGGTAC-3'

5.5.2. Zellen für die Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden entweder haploide oder diploide homozygote Δ ssh1-Hefestämme (YTX84, YTX85 oder YKF6) mit einem Plasmid, das das Myc-Epitop markierte SSH1-Gen trug (pKF14 oder pKF15, siehe 5.5.1.) oder einem entsprechenden Kontrollplasmid (pSEY8 oder pRS414) transformiert.

5.5.3. Antikörper für die Immunfluoreszenz

Als primäre Antikörper dienten ein Kaninchen-Antikörper spezifisch für Kar2p, der freundlicherweise von Dr. M. Rose zur Verfügung gestellt wurde, sowie der monoklonale Maus-Antikörper 9E10, der gegen das c-Myc-Epitop gerichtet ist und aus der Hybridomazelllinie GE10 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Behrens, Arbeitsgruppe Prof. W. Birchmeier, MDC Berlin) gewonnen wurde.

Die Hybridomzellen wurden in DMEM-Glutamax, das 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung enthielt (alle Bestandteile des Mediums von der Fa. Gibco), bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Antikörper wurden aus dem Kulturüberstand konfluenten Zellen gewonnen und über eine Protein G-Sepharose Säule gereinigt (Protein G Sepharose Fast Flow, Pharmacia). Dazu wurde eine 10 cm lange Säule mit einem Durchmesser von 1 cm (Sigma) bei 4°C mit ca. 2 ml Protein G-Sepharose (in Puffer/Ethanol) beladen, was etwa 1 ml gepacktes Säulenmaterial ergab. Zur Entfernung des Ethanols wurde mehrfach mit Wasser gewaschen. Nach luftblasenfreiem Einführen des Adapters (unter Wasser) wurden Schläuche und Säule mit weiteren 7 - 10 ml Wasser gespült. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde hier und bei den folgenden Wasch- und Äquilibrationsschritten auf etwa 0,5 ml/min eingestellt. Es folgten ein Waschschritt mit etwa 25 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und einer mit etwa 25 ml 0,1 M Glycin zur Entfernung eventuell gebundener Verunreinigungen. Anschließend wurde die Säule mit etwa 25 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert, der pH-Wert des Eluats wurde kontrolliert. Der Hybridomüberstand wurde nach Zentrifugation bei 5.000 rpm für 10 min und Sterilfiltration (Costar-Sterilfilter, Wasserstrahlpumpe) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von etwa 0,2 ml/min über die Säule gegeben. Es folgte ein Waschschritt mit etwa 40 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 (0,5 ml/min), bevor mit 0,1 M Glycin pH 2,7 (Durchflußgeschwindigkeit etwa 1 ml/min) eluiert wurde. Es wurden 15 Fraktionen von 1 ml gesammelt, die direkt in Reaktionsgefäßen, in denen zur Neutralisierung 250 µl 1 M Tris pH 8,0 vorgelegt war, aufgefangen wurden. Die Säule wurde mit weiteren 25 ml 0,1 M Glycin pH 2,7 gewaschen (0,5 ml/min), mit 20 ml

20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 wieder neutralisiert und unter 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

Die Fraktionen wurden auf ihren Protein- und damit Antikörpergehalt durch Auftropfen von 1 µl-Aliquots auf Nitrocellulose und Amidoschwarz-Anfärbung getestet. Der Hauptanteil befand sich in den Fraktionen 4 und 5. Photometrische Konzentrationsbestimmung ergab, daß aus 250 - 300 ml Hybridomüberstand etwa 5 - 6,5 mg Protein gewonnen werden konnte. Die Fraktionen 4 - 6 wurden vereinigt, à 300 µl aliquotiert und teils bei 4°C, teils bei -20°C gelagert, die Proteinkonzentration lag bei etwa 2 mg/ml.

Als sekundäre Antikörper wurden FITC (Fluorescein 5-Isothiocyanat)-goat-anti-rabbit und FITC-goat-anti-mouse, z.T. auch Cy3-goat-anti-mouse der Fa. Dianova verwendet. Letzterer neigte dazu, stark zu überstrahlen, so daß die Strukturen nicht so deutlich erkennbar waren, wie mit den FITC-markierten Antikörpern.

5.5.4. Immunfluoreszenz von Hefezellen

Transformanten wurden in 3 ml Selektionsmedium bei 30°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden sie bei einer Zelldichte von OD_{600nm} zwischen 0,5 und 1,5 zur Fixierung mit 1/10 Vol. 36% Formaldehyd versetzt und für 1 h bei 30°C schüttelnd weiter inkubiert. 0,5 OD_{600nm} Zellen wurden entnommen und für 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 300 µl 0,1 M Kaliumphosphat pH 6,5 gewaschen. Anschließend wurde wiederum für 3 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 300 µl SED (1 M Sorbit, 25 mM EDTA) gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde nun in 100 µl SED resuspendiert und zur Sphäroblastierung der Zellen mit 5 µl 1 M DTT und 10 µl Novozym (10 mg/ml in SED mit 50 mM DTT, Lagerung bei 4°C) vermischt. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für 25 - 35 min (je nach Zelltyp), bevor die sphäroblastierten Zellen wieder wie zuvor pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde in 120 - 170 µl 0,1 M Kaliumphosphat pH 6,5 resuspendiert.

In der Zwischenzeit wurden Multiwell-Objektträger (10 Vertiefungen (wells) pro Objektträger, ICN) mit Poly-L-Lysin beschichtet: Die Objektträger wurden sorgfältig mit Ethanol gereinigt. Pro Vertiefung wurden 11 µl Poly-L-Lysin (Sigma; 10 mg/ml, Lagerung bei -20°C) aufgetragen. Nach kurzer Einwirkungszeit wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt, den Rest ließ man eintrocknen. Die Objektträger wurden 3x mit dH₂O gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

Auf die vorbereiteten Objektträger wurden 15 - 20 µl der fixierten und sphäroblastierten Zellen pro Vertiefung aufgetragen, Nach etwa 2 - 3 min, in denen sich die Zellen absetzen konnten, wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt, den Rest ließ man eintrocknen (ca. 10 - 15 min). Für die folgende Permeabilisierung der Zellen wurden die Objektträger für exakt 6 min in eiskaltem Methanol (-20°C) und 30 s in eiskaltem Aceton (-20°C) inkubiert. Man ließ die Objektträger kurz (!!!) trocknen, bevor pro Vertiefung 20 µl PBS/10%FCS aufgetragen wurde (PBS: „phosphate buffered saline“, FCS: „fetal calf serum“, beides von Gibco). Nach der Permeabilisierung der Zellen ist darauf zu achten, daß diese bei den folgenden Schritten nicht mehr austrocknen!

Der primäre Antikörper wurde in PBS/10%FCS verdünnt. Für den Kaninchen-Antikörper gegen Kar2p wurde eine Verdünnung von 1:5000 verwendet, für den Maus-Antikörper 9E10 gegen das c-Myc-Epitop bewährte sich eine Verdünnung von 1:20. Pro Vertiefung wurden 20

µl der Antikörperverschüttung oder zur Kontrolle 20 µl PBS/10%FCS aufgetragen. Es erfolgte in der Regel eine Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer (alternativ: für einige Stunden bei Raumtemperatur).

Nach 10maligem Waschen der Objektträger mit PBS/10%FCS wurden die Zellen mit einer 1:100 Verdünnung des sekundären Antikörpers in PBS/10%FCS inkubiert. Auch hier wurden 20 µl des jeweiligen Antikörpers Ziege-anti-Kaninchen-FITC bzw. Ziege-anti-Maus-FITC pro Vertiefung eingesetzt. Inkubiert wurde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 1 h. Nach weiteren 10 Waschschritten mit PBS/10%FCS ließ man die Objektträger kurz trocknen, bevor sie mit Mounting Medium, das zur Anfärbung der Zellkerne DAPI (4',6-diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid) enthielt, benetzt und mit einem Deckglas versehen wurden.

Für das Mounting Medium wurden 9 ml Glycerin mit 1 ml P-Phenyldiaminlösung (10 mg/ml in PBS; cancerogen!!!) vermischt, bis die Lösung homogen war; dieser wurden 0,225 µl DAPI-Stocklösung (1 mg/ml in H₂O, Lagerung bei -20°C) zugegeben. Nach Aliquotierung wurde das Mounting Medium dunkel bei -20°C gelagert.

Mikroskopiert wurden die Zellen bei 1000facher Vergrößerung mit einem Axiophot-Mikroskop der Fa. Zeiss. Photographiert wurde mit einem Ilford HP5 Film.

5.6. Analyse des Ssh1p-Komplexes

5.6.1. Isolierung von Membranen aus Hefezellen

5.6.1.1. Membranpräparationen in analytischem Maßstab

Für Immunoblotanalysen zellulärer Membranproteine wurden Mikrosomen aus 10 OD_{600nm} exponentiell wachsender Hefezellen isoliert. Die Zellen wurden einmal mit 10 mM Azid (4°C) gewaschen und anschließend in 200 µl Homogenisierungspuffer mit 1/1.000 PI (s.u.) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mit Hilfe einer der Zellsuspension entsprechenden Volumens (1 Vol.) an Glasperlen („Glassbeads, 425 - 600 µm, acid-washed“, Fa. Sigma) durch 4 Zyklen von jeweils 30 s mixen auf dem Vortex bei höchster Stufe unterbrochen von 30 s Kühlen auf Eis. Das Zelllysate wurde von den „Glassbeads“ mit zweimal 500 µl Homogenisierungspuffer, der 1/10.000 PI enthielt, abgenommen und bei 400 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 12.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das resultierende Membranpellet wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert.

Homogenisierungspuffer:

50 mM Tris pH 7,5
10 mM EDTA
(Lagerung bei 4°C)

Proteaseinhibitoren-Mix (PI):

10 mg/ml Leupeptin in dH₂O
5 mg/ml Chymostatin in DMSO
5 mg/ml Pepstatin in DMSO
(Lagerung bei -20°C)

SDS-Probenpuffer:

2 % SDS
10 % Glycerin
60 mM Tris-Base
50 mM DTT
0,02 % Bromphenolblau
(Lagerung ohne DTT bei Raumtemperatur,
mit DTT bei -20°C)

5.6.1.2. Isolierung von Hefemikrosomen in präparativem Maßstab

Hefemikrosomen in präparativem Maßstab wurden je nach Bedarf aus 5 l oder 1 l Hefekultur in exponentiellem Wachstum gewonnen. Aus 5 l Kultur entsprechend etwa 80 g Hefen (Feuchtgewicht) konnten ca. 75.000 eq rauhe Mikrosomen und aus 1 l Kultur entsprechend etwa 7 -12 g Hefen (abhängig vom Stamm) ca. 7.000 - 9.000 eq rauhe Mikrosomen isoliert werden. Dabei ist 1 Äquivalent (eq) an Membranen definiert als 1 ml einer Membransuspension mit einer Absorption von 50 bei 280 nm ($OD_{280nm} = 50$).

Präparationen aus 5 l Kultur:

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3.000 rpm für 10 min geerntet (K80-Zentrifuge) und das Feuchtgewicht bestimmt. Die Zellpellets wurden in 600 ml Waschpuffer (4°C) resuspendiert und erneut für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5-Zentrifuge, GS3-Rotor). Anschließend wurden die Zellpellets in 20 ml 5x-Homogenisierungspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte unter ständiger Kühlung durch zwei dreiminütige Läufe in einer Glasmühle (Dynamill, W. A. Bachofen, Basel, Schweiz). Das Homogenat wurde mit etwa 500 ml 1x-Homogenisierungspuffer aus der Mühle gespült und für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5-Zentrifuge, GS3-Rotor). Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 10 min bei 9.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5-Zentrifuge, GS3-Rotor). Aus diesem vom Pellet sauber getrennten Überstand wurden im folgenden die Mikrosomen durch Zentrifugation bei 25.000 rpm und 4°C für 35 min gewonnen (Beckman-Ultrazentrifuge, TI45-Rotor). Der Überstand, das Zytosol, wurde abgenommen und in der Regel für andere Experimente in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zurück blieb ein lockeres Membranpellet, das in 30 ml Membranpuffer resuspendiert wurde. Für eine Absorptionsmessung wurden die Mikrosomen 1 : 100 in 2 % SDS verdünnt. Das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} lag in der Regel bei 1,7. Die rauen Mikrosomen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Waschpuffer:

50 mM	Hepes pH 7,5
25 mM	Kaliumacetat
5 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA
2 mM	DTT
1 mM	PMSF
(DTT und PMSF wurden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)	

1x-Homogenisierungspuffer:

50 mM	Hepes pH 7,5
10 %	Glycerin
25 mM	Kaliumacetat
5 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA
2 mM	DTT
1 mM	PMSF
(DTT und PMSF wurden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)	

5x-Homogenisierungspuffer:

250 mM	Hepes pH 7,5
50 %	Glycerin
25 mM	Kaliumacetat
5 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA
5 mM	DTT
1/1.000	PI
2 mM	PMSF
(DTT, PI und PMSF wurden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)	

Membranpuffer:

50 mM	Hepes pH 7,5
10 %	Glycerin
2 mM	DTT
1/10.000	PI
(DTT und PI wurden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)	

Präparationen aus 1 l Kultur:

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3.000 rpm für 10 min gererntet (K80-Zentrifuge) und das Feuchtgewicht bestimmt. Die Zellpellets wurden in 40 ml Aufschlußpuffer ohne PI (4°C) gewaschen, in 50 ml-Falcontubes überführt und erneut für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus-Zentrifuge). Anschließend wurden die Zellpellets in 20 ml Aufschlußpuffer mit PI pro 10g Feuchtmasse resuspendiert und in 70 ml-Zylinder für den Homogenisator überführt. Nach Zugabe von 10 g „Glassbeads“ (Fa. Sigma) erfolgte der Zellaufschluß im Homogenisator unter CO₂-Kühlung durch drei Läufe für jeweils 40 s mit zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis. Das Homogenat wurde von den „Glassbeads“ abgenommen (diese wurden einmal mit Aufschlußpuffer nachgespült) und in Heraeus Zentrifugengefäßen für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 15 min bei 9.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Aus diesem vom Pellet sauber getrennten Überstand wurden im folgenden die Mikrosomen durch Zentrifugation bei 25.000 rpm und 4°C für 35 min gewonnen (Beckman-Ultrazentrifuge, TI70-Rotor). Der Überstand, das Zytosol, wurde abgenommen und in der Regel für andere Experimente in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zurück blieb ein lockeres Membranpellet, das in 10 ml Membranpuffer resuspendiert wurde. Für eine Absorptionsmessung wurden die Mikrosomen 1 : 100 in 2 % SDS verdünnt. Das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} lag in der Regel bei 1,5 - 1,7. Die rauen Mikrosomen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Aufschlußpuffer:

50 mM	Hepes pH 7,6
250 mM	Saccharose
150 mM	Kaliumacetat
5 mM	Magnesiumacetat
2 mM	DTT
1 mM	PMSF
1/1.000	PI (beim Aufschluß !)

(DTT, PMSF und ggf. PI wurden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)

Membranpuffer:

50 mM	Hepes pH 7,6
250 mM	Saccharose
2 mM	DTT

(DTT wurde erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)

5.6.2. Herstellung von Digitoninextrakten aus Hefemikrosomen

Zur Herstellung von Digitoninextrakten für analytische Zwecke (z.B. Immunpräzipitationen) wurden rauhe Mikrosomen zunächst mit einem Hochsalzpuffer gewaschen. Dazu wurden 4.000 eq Mikrosomen für 15 min bei 70.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge, 100.4-Rotor) und in 3 ml Hochsalzpuffer in einem 5 ml-Dounce-Homogenisator (aus der S-Serie der Fa. Braun, Melsungen) auf Eis resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, noch einmal gut homogenisiert und anschließend erneut wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Das Pellet wurde in 2 ml Digitoninpuffer im Dounce-Homogenisator auf Eis resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und während dieser Zeit hin und wieder vorsichtig homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 70.000 rpm und 4°C (Beckman-Ultrazentrifuge, 100.4-Rotor). Der resultierende Überstand, der Digitoninextrakt (DE), wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren, das Digitoninpellet (DP) mit dem Dounce-Homogenisator in 2 ml dH₂O resuspendiert und ebenfalls eingefroren. Gelagert wurden die Proben bei -70°C.

Hochsalzpuffer:

50 mM	Hepes pH 7,6
5 %	Glycerin
800 mM	Kaliumacetat
16 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA
2 mM	DTT
1/5.000	PI

(DTT und PI wurden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)

Digitoninpuffer:

2,5 %	Digitonin
50 mM	Hepes pH 7,6
10 %	Glycerin
400 mM	Kaliumacetat
8 mM	Magnesiumacetat
2 mM	DTT
1/5.000	PI

(DTT und PI wurden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)

Wurden größere Mengen an Digitoninextrakten benötigt, z.B. für die Reinigung des Ssh1-Komplexes, wurde im wesentlichen wie bei Panzner et al. (1995) beschrieben verfahren: 20.000 eq rauhe Mikrosomen wurden mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis in dem dreifachen Volumen Saponinpuffer vermischt, so daß sich eine Endkonzentration von 2,5 % Saponin und 800 mM Kaliumacetat ergab. Es folgte eine Inkubation für 30 min mit anschließender Zentrifugation bei 35.000 rpm und 4 °C für 70 min (Beckman-Ultrazentrifuge, TI70-Rotor), bei der Partikel größer 100 S sedimentiert wurden. Der Überstand, der Saponinextrakt, wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Das Pellet wurde mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis in 10 ml Digitoninpuffer resuspendiert, wieder für 30 min inkubiert, währenddessen hin und wieder vorsichtig homogenisiert und anschließend bei 75.000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge, 100.3-Rotor). Dabei wurden Partikel größer 60 S sedimentiert. Das resultierende Digitoninpellet wurde gegebenenfalls ein zweites Mal mit dem halben Volumen Digitoninpuffer extrahiert, die Überstände vereinigt und als Digitoninextrakt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Saponinpuffer:

3,3 %	Saponin
50 mM	Hepes pH 7,6
5 %	Glycerin
1,07 M	Kaliumacetat
21 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA
2 mM	DTT (oder 5 mM β -Mercaptoethanol)
1/5.000	PI

(DTT und PI werden erst kurz vor Gebrauch dazugegeben)

5.6.3. Präparation von RAMP-Fractionen

Zur Isolierung ribosomen-assoziiierter Membranproteine (RAMP-Fraktion) wurde zunächst verfahren wie bei der Herstellung der Digitoninextrakte. Das Digitoninpellet wurde einer zweiten Digitoninextraktion unterzogen und aus dem daraus resultierenden zweiten Digitoninpellet die ribosomengebundenen Membranproteine durch Behandlung mit Puromycin unter hohen Salzkonzentrationen freigesetzt. Dazu wurde das Pellet in

Puromycinpuffer mit dem Dounce-Homogenisator sorgfältig resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis wurde nochmal 0,2 mM GTP hinzugegeben, die Suspension im Wasserbad auf 28°C erwärmt und für weitere 30 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 40 min bei 100.000 rpm und 4°C (Beckman-Ultrazentrifuge, 100.4-Rotor). Der resultierende Überstand, die RAMP-Fraktion, wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Puromycinpuffer:

2,5 %	Digitonin
100 mM	Hepes pH 7,6
10 %	Glycerin
800 mM	Kaliumacetat
16 mM	Magnesiumacetat
5 mM	DTT
1/2.000	PI
2 mM	Puromycin-2HCl
0,2 mM	GTP

5.6.4. Antikörper

Proteine wurden in der Regel durch SDS-PAGE und Immunoblotting untersucht. Folgende Peptidantikörper wurden für die Analysen eingesetzt:

Zielprotein	Peptid zur Immunisierung	Herkunft
Ssh1p	CNQVLGVPGAM	Cys + C-Terminus Ssh1p
Ssh1p	MSGFRLIDIVKC	N-Terminus Ssh1p + Cys
Sbh2p	AASVPPGGQRIC	N-Terminus Sbh2p + Cys
Sec61p	CLVPGFSDLM	Cys + C-Terminus Sec61p
Sbh1p	CPTPPGGQRTLQKRK	Cys + Pos. 4-17 Sbh1p
Sss1p	ARASEKGEEKKQSCA	N-Terminus Sss1p + Cys-Ala
Sec62p	CNKKKAINEKAEQN	Cys + C-Terminus Sec62p
Sec71p	CELKINNDGRLVN	Cys + C-Terminus Sec71p
Sec72p	CTARNMAEYNGE	Cys + C-Terminus Sec72p

Die Immunisierung von Kaninchen mit den drei erstgenannten antigenen Peptiden sowie die Affinitätsreinigung der gewonnenen Antisera wurde wie bei Görlich et al., 1992 beschrieben ausgeführt. Die übrigen Antisera lagen bereits vor.

Als sekundäre Antikörper in Immunoblots wurden Peroxidase (POD)-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Fa. Sigma) oder (für Analysen von Immunpräzipitationen) POD-gekoppeltes Protein A (Fa. Sigma) verwendet. Die Detektion im Blot erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemiluminescence System) der Fa. Amersham.

5.6.5. Immunpräzipitationen

Für Immunpräzipitationen wurden je Ansatz 100 eq Digitoninextrakt oder 200 eq RAMP-Fraktion mit 20 µl des jeweiligen Antiserums bei 4°C über Nacht unter ständiger Durchmischung auf einem Inkubationsrad inkubiert. Am folgenden Tag wurde 50 µl ProteinA-Sepharose („Protein Sepharose beads, 4 fast flow“, Pharmacia) pro Ansatz zur Entfernung des Ethanol dreimal mit IP-Puffer gewaschen und mit LD-Puffer (Low salt Digitonin buffer) äquilibriert. Die äquilibrierte Sepharose wurde mit dem Immunpräzipitationsansatz 1 h bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit LD-Puffer, dem 200 mM Kaliumacetat zugesetzt war, und einmal mit dH₂O gewaschen und schließlich in SDS-Probenpuffer mit DTT aufgenommen. Lagerung der Proben war bei -20°C möglich. Durch Inkubation bei 65°C für 10 min konnten die Präzipitate von der Sepharose abgelöst und mit SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot analysiert werden. Dabei wurde im allgemeinen 1/10 des Ansatzes aufgetragen.

IP-Puffer:

10 mM	Tris pH 7,5
150 mM	Natriumchlorid

LD-Puffer:

20 mM	Hepes pH 7,5
10 %	Glycerin
1 %	Digitonin
2 mM	DTT

5.6.6. Reinigung des Ssh1-Komplexes (nach S. Panzner)

Zur Reinigung des Ssh1-Komplexes wurden 20.000 eq Digitoninextrakt zunächst mit SP-Sepharose vorfraktioniert. Dazu wurde der Extrakt mit LD-Puffer soweit verdünnt, daß die Salzkonzentration 150 mM betrug, und mit SP-Sepharose (1 ml Sepharose pro 40 OD_{280nm}-Einheiten) für 1 h inkubiert. Extrakt und Sepharose wurden anschließend in einer offenen Säule getrennt: Zunächst wurde der Austausch mit 2 Säulenvolumina einer Mischung aus 20 % HD-Puffer und 80 % LD-Puffer gewaschen, anschließend wurden die gebundenen Proteine mit einer Mischung aus 80 % HD-Puffer und 20 % LD-Puffer von der Sepharose eluiert. Nach grober Fraktionierung wurden die Peakfraktionen (spektrometrische Bestimmung) vereinigt und im weiteren verwendet. Das Eluat wurde über Nacht gegen 1 l Puffer (20 mM Hepes pH7,5, 1 mM Magnesiumacetat, 400 mM Saccharose und 2 mM DTT) dialysiert. Ausgefallene Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Beckman-Ultrazentrifuge, 100.4-Rotor, 75.000 rpm, 20 min) und die Überstände über eine 20 ml-Säule mit Q-Sepharose Fast Flow, die mit 15 ml LD-Puffer mit 1/10.000 PI äquilibriert war, gegeben. Die dem Durchlauf entsprechenden Fraktionen wurden an eine 1 ml-SP-Sepharose-Säule (HiTrap SP, Pharmacia) gebunden. Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml LD-Puffer, bevor mit 30 ml eines linearen Gradienten von 15 bis 65 % HD/LD-Puffer eluiert wurde. Dabei wurden Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen.

HD-Puffer:

50 mM	Hepes pH 7,5
1,2 M	Kaliumacetat
10 %	Glycerin
1 %	Digitonin
2 mM	DTT

5.7. Akkumulation von Präkursor-Proteinen in mutanten Zellen

5.7.1. Klonierung des SSH1-Gens unter Kontrolle des GAL10-Promotors

Ein 1521 bp EcoRV/SnaBI-Fragment aus pSEC61VII, das bis auf die ersten 24 Nukleotide die gesamte kodierende Region des Gens beinhaltete, wurde in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pGEM5Z kloniert. Dabei wurde die Orientierung des Inserts benötigt, bei der die Sall-Schnittstelle des Vektors auf der 5'-Seite des Inserts gelegen war. Das resultierende Plasmid wurde mit pTAR1 bezeichnet. Durch einen Linker, der aus zwei komplementären Oligonukleotiden (1379 und 1380, s.u.) gebildet wurde, wurde die fehlende Startregion des SSH1-Gens rekonstituiert. Dabei wurde direkt vor dem Startcodon eine Sall-Schnittstelle eingeführt und die bei dem ersten Klonierungsschritt verwendete EcoRV-Schnittstelle durch eine stumme Mutation zerstört (Pos. +24: Austausch T gegen C). Der Linker wurde in das mit Sall und EcoRV aufgeschnittene Plasmid pTAR1 ligiert, resultierend in pTAR2. Ein 1588 bp ApaI/Sall-Fragment aus pTAR2 wurde schließlich in die Sall-Schnittstelle des Vektors pF1M kloniert, so daß das SSH1-Gen unter Kontrolle des GAL10-Promotors war (pTX75). Aus pTX75 wurde die GAL10-SSH1-Fusion mit EcoRV und BamHI ausgeschnitten und in den SmaI/BamHI-geschnittenen Hefvektor pRS416 kloniert, resultierend in dem Plasmid pTX88.

1379-29: 5'-TCGACATGTCTGGTTTTTCGTCTAATTGAC-3'
1380-25: 5'-GTCAATTAGACGAAAACCAGACATG-3'

5.7.2. Radioaktive Markierung der Zellen und Immunpräzipitation

Aus exponentiell wachsenden Hefekulturen in Minimalmedium wurden pro Immunpräzipitationsansatz 2 OD_{600nm} Zellen entnommen, abzentrifugiert (2.000 rpm, 2 min, Raumtemperatur) und in 300 µl des jeweiligen, vorgewärmten Kulturmediums resuspendiert. Nach Zugabe von 80 µCi [³⁵S]-Methionin wurden die Zellen bei der entsprechenden Inkubationstemperatur (30°C oder 38°C) für 10 min inkubiert. Zugabe von 300 µl eiskaltem Natriumazid beendete die Markierung. Es folgte eine Zentrifugation bei 5.000 rpm für 2 min. Das Zellpellet wurde in 100 µl SDS-Auflösungspuffer (1 % SDS, 50 mM Tris pH 7,5, PI (1:5.000)) auf Eis resuspendiert und mit 1 Vol. „Glassbeads“ (Sigma) versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte durch zwei Zyklen 30 s Lyse auf dem Vortex/30 s Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von weiteren 100 µl SDS-Auflösungspuffer wurde das Lysat für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend mit zweimal 400 µl IP-Verdünnungspuffer (1,25 % Triton, 190 mM NaCl, 60 mM Tris pH 7,5, 6 mM EDTA) von den „Glassbeads“ abgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5-10 min bei 4°C wurde der Überstand für die Immunpräzipitation mit 1 µl Antikörper gegen Kar2p bzw. alpha-Faktor eingesetzt. Die verwendeten Antiseren wurden freundlicherweise von Dr. M. Rose bzw. Dr. R. Schekman zur Verfügung gestellt.

Für Immunpräzipitationen mit dem Invertase-Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Howard Riezman, Basel) wurden die Zellen vor der radioaktiven Markierung für 20 - 25 min in Kulturmedium mit 0,1 % Glucose (statt 2 %) inkubiert, um so eine Dereprimierung des Invertase-Gens zu erreichen. Außerdem wurde die Immunpräzipitation in größerem Volumen als für die anderen beiden Antikörper durchgeführt: Der markierte Zelllysate-Überstand (ca. 1 ml) wurde mit 4 ml IP-Puffer (1 % Triton, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA) verdünnt. 5 µl des zur Verfügung stehenden Invertase-Antikörpers wurden zugesetzt.

6. Anhang

6.1. Zellen und Plasmide

Es folgt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten vorhandenen oder neu konstruierten Plasmide, Vektoren, Bakterien- und Hefestämme:

6.1.1. Bakterienstämme

Als Wirtsstämme für Plasmidkonstrukte wurden entweder der *E. coli*-Stamm XL-1 blue (Stratagene) oder DH5 α (Hanahan, 1983) verwendet. Für die *in vitro* Mutagenese wurde der Stamm JM109 (Promega) benutzt.

6.1.2. Vektoren

Vektor	Charakteristika	Herkunft oder Referenz
pSEY8	2 μ m, URA3, Amp ^R	Emr, S.D. et al., 1986
pALTER TM -1	Tet ^R , amp ^S	„Altered Sites TM <i>in vitro</i> Mutagenesis System“, Promega
pBluescript	Amp ^R , lacZ mit MCS	Stratagene
pUC19	Amp ^R , lacZ mit MCS	GenBank # X02514
pGEM-T	Amp ^R , lacZ mit MCS, in der MCS linearisierter Vektor mit überhängenden T-Enden zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega
pRS414	ARS/CEN, TRP1, Amp ^R	Sikorski und Hieter, 1989
pRS415	ARS/CEN, LEU2, Amp ^R	Sikorski und Hieter, 1989
pRS416	ARS/CEN, URA3, Amp ^R	Sikorski und Hieter, 1989
pRS424	2 μ m, TRP1, Amp ^R	Sikorski und Hieter, 1989
pRS425	2 μ m, LEU2, Amp ^R	Sikorski und Hieter, 1989
pRS426	2 μ m, URA3, Amp ^R	Sikorski und Hieter, 1989
pF1	Amp ^R , GAL10 (1,5 kb-EcoRI Fragment mit dem GAL10-Promotor, kloniert in die EcoRI Schnittstelle des Vektors pUC19.)	M. Manske
pF1M	Amp ^R , GAL10 (Deletion eine 12 bp-PstI/XbaI_Fragmentes aus der MCS des Vektors pF1 resultiert in einer unikalen SalI-Schnittstelle des Vektors pF1M.)	C. Volkwein T.A. Rapoport

Plasmide, die eine ARS/CEN-Region oder einen 2 μ m-ori tragen, können als Shuttle Vektoren zwischen *E. coli* und Hefe eingesetzt werden. ARS/CEN-Plasmide liegen in einer Kopienzahl von 1 - 2 pro Zelle, 2 μ m-Plasmide in einer Kopienzahl von 2 - 100 pro Zelle vor.

6.1.3. Plasmide

Plasmid	Vektor	Insert	Wirtsstamm	Herkunft oder Referenz
pSEC61V II (später pSSH1)	pSEY8 (2µm, URA3)	3545 bp-Insert: SSH1 -Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit natürlichem Promotor		isoliert aus genomischer pSEY8-Hefe-Bank; E.Hartmann
pS61b-II (später pSBH2)	pSEY8 (2µm, URA3)	Klon 11/87, enthält das SBH2 -Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		isoliert aus genomischer pSEY8-Hefe-Bank; E.Hartmann, K.Finke
HCS12	pSEY8	SEC61 -Gen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		isoliert aus genomischer pSEY8-Hefe-Bank
bsHIS	pBluescript	BamHI-Fragment mit HIS3 -Gen aus YEP6		Dr. W. Seufert
pUC-HIS	pUC18	SacI/SalI-Fragment mit HIS3 -Gen aus bsHIS		Dr. W. Seufert
bsLEU	pBluescript	SmaI/PstI-Fragment mit LEU2 -Gen aus pUC-LEU		Dr. W. Seufert
pASZ11	pUC19	ARS-CEN -Plasmid mit ADE2 -Gen		Stotz und Linder, 1990
pKF1	pUC19	ca. 2,4 kb HindIII-Fragment aus HCS12 mit dem S.c. SEC61 -Gen	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF2	pUC19	1671 bp-PstI/SnaBI-Fragment aus pSEC61VII mit dem vollständigen SSH1 -Gen, kloniert in die PstI/SmaI-Schnittstelle von pUC19	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF3	pBluescript	1755 bp-NheI/SnaBI-Fragment aus pSEC61VII mit dem vollständigen SSH1 -Gen, kloniert in die XbaI/EcoRV-Schnittstelle des pBluescript-Vektors	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF4	pUC19	1755 bp-NheI/SnaBI-Fragment aus pSEC61VII mit dem vollständigen SSH1 -Gen, kloniert in die XbaI/SmaI-Schnittstelle von pUC19	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF5	pBluescript	knock-out-Allel des SSH1 -Gens, hergestellt durch Deletion des größten Teiles der kodierenden Region (1171 bp-EcoRV/EcoRI-Fragment aus pKF3) und Insertion eines ca. 1,9 kb-SmaI/EcoRI-Fragmentes aus dem Plasmid pUC-HIS, resultierend in Dssh1::HIS3	XL-1 blue	diese Arbeit

Plasmid	Vektor	Insert	Wirtsstamm	Herkunft oder Referenz
pKF6	pUC19	Vorläuferkonstrukt für pKF7: Insertion eines BamHI-Linkers in die EcoRV-Schnittstelle von pKF4	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF7	pBluescript	knock-out-Allel des SSH1-Gens, hergestellt durch Deletion des größten Teiles der kodierenden Region (649 bp-BamHI/BglII-Fragment aus pKF6) und Insertion eines 2243 bp BglII-Fragmentes aus dem Plasmid pASZ11, resultierend in Dssh1::ADE2	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF8	pGEM-T	PCR-Produkt 945/411: C-Terminus des SSH1-Gens (Nukleotide 1206 - 1484) mit Myc-Epitop (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF9	pGEM-T	PCR-Produkt 1264/411: C-Terminus des SSH1-Gens (Nukleotide 948 - 1484) mit Myc-Epitop (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF10	pGEM-T	PCR-Produkt 1263/411: C-Terminus des SSH1-Gens (Nukleotide 741 - 1484) mit Myc-Epitop (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF11	pALTER	ca. 1,2 kb-EcoRI-Fragment aus pSEC61VII, kloniert in pALTER für in-vitro-Mutagenese	JM109	diese Arbeit
pKF12	pALTER	wie pKF11 mit KpnI-Schnittstelle 5' vom Stopcodon des SSH1-Gens, eingeführt durch stumme Mutagenese	JM109	diese Arbeit
pKF13	pSEY8 (2µm, URA3)	Substitution des 1,2 kb-EcoRI-Fragments in pSEC61VII durch das 1,2 kb-EcoRI-Fragment aus pKF12 mit der KpnI-Schnittstelle 5' vom Stopcodon des SSH1-Gens	DH5α	diese Arbeit
pKF14	pSEY8 (2µm, URA3)	Insertion eines Linkers aus zwei komplementären Oligonukleotiden (1098 und 1099) in die neu-eingeführte KpnI-Schnittstelle von pKF13 resultierte in einem SSH1-Allel mit Myc-Epitop am C-Terminus: SSH1^{MYC}	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF15	pRS414 (ARS/CEN TRP1)	ca. 2,5 kb-SmaI/SalI-Fragment aus pKF14 mit SSH1^{MYC}	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF16	pRS414 (ARS/CEN TRP1)	ca. 2,5 kb-SmaI/SalI-Fragment aus pSEC61VII mit dem SSH1 -Gen	XL-1 blue	diese Arbeit

Plasmid	Vektor	Insert	Wirtsstamm	Herkunft oder Referenz
pKF17	pGEM-T	PCR-Produkt 1763/1764: ein 232 bp-Fragment der 5' flankierenden Region des SBH2-Gens (Nukleotide -215 bis +17) mit einer XbaI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF18	pGEM-T	PCR-Produkt 1765/1766: ein 411 bp-Fragment der 3' flankierenden Region des SBH2-Gens (Nukleotide +227 bis +637) mit einer BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF19	pBluescript	das 232 bp-Fragment aus pKF17 und das 411 bp-Fragment aus pKF18, kloniert in die XbaI/EcoRI-Schnittstelle des pBluescript-Vektors	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF20	pBluescript	Insertion eines 2,2 kb-BglII-Fragmentes aus pASZ11 in die BamHI-Schnittstelle von pKF19, resultierend in Dsbh2::ADE2 .	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF21	pBluescript	Insertion eines 1,7 kb-BamHI-Fragmentes aus pUC-HIS in die BamHI-Schnittstelle von pKF19, resultierend in Dsbh2::HIS3 .	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF22	pGEM-T	PCR-Produkt 401/404: C-Terminus des S.c. SEC61-Gens (Nukleotide 1192 bis 1765) mit Myc-Epitop vor dem Stop-Codon (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF23	pUC19	Substitution des 363 bp- StyI/AflII-Fragments in pKF1 durch das 392 bp StyI/AflII-Fragment aus pKF22, resultierend in einem SEC61-Allel mit Myc-Epitop am C-Terminus: SEC61^{MYC}	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF24	pGEM-T	PCR-Produkt 94/95: ein 410 bp-Fragment der 5' flankierenden Region des SBH1-Gens (Nukleotide -387 bis +23) mit einer XbaI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF25	pGEM-T	PCR-Produkt 154/97: ein 361 bp-Fragment der 3' flankierenden Region des SBH1-Gens (Nukleotide +224 bis + 584) mit einer BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit

Plasmid	Vektor	Insert	Wirtsstamm	Herkunft oder Referenz
pKF26	pGEM-T	PCR-Produkt 94/97: das 971 bp-Fragment enthält das SBH1-Gen (Nukleotide -387 bis + 584) mit einer XbaI -Schnittstelle am 5'-Ende und einer EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende (2 Klone (15 und 21), teilsequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF27	pGEM-T	PCR-Produkt 140/141: das 359 bp-Fragment enthält den kodierenden Bereich des SBH2-Gens (Nukleotide +1 bis + 359) flankiert durch eine SalI- und eine NcoI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine KpnI-Schnittstelle am 3'-Ende (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF28	pGEM-T	PCR-Produkt 142/143: das 374 bp-Fragment enthält den kodierenden Bereich des SBH1-Gens (Nukleotide +1 bis + 374) flankiert durch eine SalI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine KpnI-Schnittstelle am 3'-Ende (sequenziert)	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF29	pBluescript	das 410 bp-Fragment aus pKF24 und das 361 bp-Fragment aus pKF25, kloniert in die XbaI/EcoRI-Schnittstelle des pBluescript-Vektors	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF30	pBluescript	Insertion eines 1,7 kb-BamHI-Fragmentes aus pUC-HIS in die BamHI-Schnittstelle von pKF29, resultierend in Dsbh1::HIS3 .	XL-1 blue	diese Arbeit
pKF31	pRS415 (ARS/CEN LEU2)	ca. 1,8 kb-BamHI/HindIII-Fragment aus pEK4 mit dem SSS1-Gen unter Kontrolle des induzierbaren GAL-Promotors: GAL-SSS1 .	XL-1 blue	K. Finke
pKF32	pRS416 (ARS/CEN URA3)	ca. 2,5 kb-HindIII-Fragment aus pKF23 mit SEC61^{MYC} .	XL-1 blue	K. Finke
pKF33	pRS426 (2µm, URA3)	ca. 2,5 kb-HindIII-Fragment aus pKF23 mit SEC61^{MYC} .	XL-1 blue	K. Finke
pTX73	pUC19	knock-out-Allel des SSH1-Gens, hergestellt durch Deletion des größten Teiles der kodierenden Region (649 bp EcoRV/BglII-Fragment aus pKF4) und Insertion eines ca. 2,2 kb-BamHI/SmaI-Fragmentes aus bsLEU, resultierend in Dssh1::LEU2	XL-1 blue	C. Volkwein K. Finke

Plasmid	Vektor	Insert	Wirtsstamm	Herkunft oder Referenz
pTAR1	pGEM5Z	1521 bp EcoRV/SnaBI-Fragment aus pSEC61VII, das bis auf die ersten 24 Nukleotide die gesamte kodierende Region des SSH1-Gens beinhaltete, kloniert in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pGEM5Z.		C. Volkwein T.A. Rapoport
pTAR2	pGEM5Z	Insertion eines Linkers aus zwei komplementären Oligonukleotiden (1379/1380) in das mit SalI und EcoRV aufgeschnittene Plasmid pTAR1. Rekonstitution der Startregion des SSH1-Gens durch den Linker unter Einführung einer SalI-Schnittstelle unmittelbar vor dem Startcodon und Zerstörung der EcoRV-Schnittstelle durch stumme Mutagenese.		C. Volkwein T.A. Rapoport
pTX75	pF1M	1588 bp ApaI/SalI-Fragment aus pTAR2 kloniert in die SalI-Schnittstelle des Vektors pF1M, so daß das SSH1-Gen unter Kontrolle des GAL10-Promotors war: GAL-SSH1 .		C. Volkwein T.A. Rapoport
pTX88	pRS416 (ARS/CEN URA3)	2792 bp-EcoRV/BamHI-Fragment aus pTX75 mit GAL10-SSH1 -Fusion, kloniert in den SmaI/BamHI-geschnittenen Hefevektor pRS416.		C. Volkwein T.A. Rapoport

6.1.4. Hefestämme

Stamm	Genotyp	Bemerkungen	Herkunft oder Referenz
YFP338	mat α , sec 61-2 , leu 2-3,-112, ura 3-52, ade 2-3, pep 4-3		Rose et al., 1989
YTX69	mat a / α , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100		Hartmann et al., 1994
YTX77	mat a / α , Dss1::ADE2/SSS1 homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX69	Hartmann et al., 1994
YTX80	mat a , Dss1::ADE2 , pGALSEC61g his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX77 durch Transformation mit pGALSEC61 γ nachfolgender Tetradendisektion	Hartmann et al., 1994

Stamm	Genotyp	Bemerkungen	Herkunft oder Referenz
YTX 83	mat a/α , Δ ssh1::LEU2/SSH1, homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX69 durch Transformation mit pTX73	T.Sommer C.Volkwein
YTX 84	mat α , Dssh1::LEU2 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX83 durch Tetradendisektion	T.Sommer C.Volkwein
YTX 85	mat a , Dssh1::LEU2 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX83 durch Tetradendisektion	T.Sommer C.Volkwein
YTX86	mat a , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX83 durch Tetradendisektion	T.Sommer C.Volkwein
YTX87	mat α , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX83 durch Tetradendisektion	T.Sommer C.Volkwein
YKF5	mat α , sec 61-2 , Dssh1::ADE2 , leu 2-3,-112, ura 3-52, ade 2-3, pep 4-3	entstanden aus YFP338 durch Transformation mit pKF7	K.Finke
YKF6	mat a/α , Dssh1::LEU2/Dssh1::LEU2 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden durch Kreuzung von YTX84 und YTX85	K.Finke
YKF7	mat a/α , Dsbh1::HIS3/SBH1 , Dsbh2::ADE2/SBH2 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX69 durch Transformation mit pKF20 und pKF30	K.Finke
YKF8	mat α , Dsbh1::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF7 durch Tetradendisektion	K.Finke
YKF9	mat α , Dsbh2::ADE2 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF7 durch Tetradendisektion	K.Finke
YKF10	mat a , Dsbh1::HIS3 , Dsbh2::ADE2 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF7 durch Tetradendisektion	K.Finke
YKF11	mat a , Dsbh2::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX69 durch Transformation mit pKF21 und nachfolgender Tetradendisektion	K.Finke
YKF12	mat α , Dsbh2::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX69 durch Transformation mit pKF21 und nachfolgender Tetradendisektion	K.Finke
YKF13	mat a , Dsbh1::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX86 durch Transformation mit pKF30	K.Finke

Stamm	Genotyp	Bemerkungen	Herkunft oder Referenz
YKF14	mat a, Dsbh1::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF7 durch Tetradendissektion	K.Finke
YKF15	mat a, Dsbh2::ADE2 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF7 durch Tetradendissektion	K.Finke
YKF16	mat α , Dsbh1::HIS3 , Dsbh2::ADE2 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF7 durch Tetradendissektion	K.Finke
YKF17	mat a/ α , Dssh1::LEU2/SSH1 , Dsbh2::HIS3/SBH2 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden durch Kreuzung von YTX84 und YKF11	K.Finke
YKF18	mat a/ α , Dssh1::LEU2/SSH1 , Dsbh2::HIS3/SBH2 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden durch Kreuzung von YTX85 und YKF12	K.Finke
YKF19	mat α , Dssh1::LEU2 , Dsbh2::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YTX84 durch Transformation mit pKF21	K.Finke
YKF20	mat a/ α , Dssh1::LEU2/SSH1 , Dsbh1::HIS3/SBH1 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden durch Kreuzung von YTX85 und YKF8	K.Finke
YKF21	mat a/ α , Dssh1::LEU2/SSH1 , Dsbh2::ADE2/SBH2 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden durch Kreuzung von YTX85 und YKF9	K.Finke
YKF22	mat a/ α , Dssh1::LEU2/SSH1 , Dsbh1::HIS3/SBH1 , Dsbh2::ADE2/SBH2 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden durch Kreuzung von YTX85 und YKF10	K.Finke
YKF23	mat a/ α , Dssh1::LEU2/SSH1 , Dsbh2::ADE2/SBH2 , Dsbh1::HIS3/Dsbh1::HIS3 , homozygot his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden durch Kreuzung von YKF25 und YKF10	K.Finke
YKF24	mat a, Dssh1::LEU2 , Dsbh1::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF20 durch Tetradendissektion	K.Finke
YKF25	mat α , Dssh1::LEU2 , Dsbh1::HIS3 , his 3-11,-15, leu 2-3,-112, trp 1-1, ura 3-1, ade 2-1, can 1-100	entstanden aus YKF20 durch Tetradendissektion	K.Finke

6.2. Vergleich der Nukleotidsequenzen der beiden SEC61 α -Gene in Säugerzellen

Im folgenden werden die Nukleotidsequenzen der beiden SEC61 α -Gene aus vier Säugerspezies miteinander verglichen. Die Sequenzen der beiden humanen Gene HS-SEC61 α -I und -II (HS-1 und HS-2) stammen aus dem Screening einer cDNA-Bank aus HeLa-Zellen, die Sequenzen der Gene RN-SEC61 α -I und -II (RN-1 und RN-2) aus dem Screening einer cDNA-Bank aus Ratten-Leber und die Sequenzen der Gene CF-SEC61 α -I und -II (CF-1 und CF-2) aus dem Screening einer cDNA-Bank aus MDCK-Zellen (Madin-Darby-canine kidney-Zellen). Die Sequenzen der beiden Maus-Gene MM-SEC61 α -I und -II (MM-1 und MM-2) wurden im Zuge der in dieser Arbeit vorgestellten RT-PCR-Experimente ermittelt. Ergänzt werden sie durch Sequenzinformation aus ESTs (markiert durch Unterstreichen mit einer Wellenlinie), die in der GenBank des NCBI veröffentlicht sind (Marra, M. et al., Mouse EST Project; für MM-1: Acc.No. AA410008 und AA245328; für MM-2: Acc.No. AI006571). Die Nukleinsäurereste der Sequenzen sind grundsätzlich in Großbuchstaben angegeben. Kleine Buchstaben markieren Basen, die nicht vollkommen eindeutig zu lesen waren; mit „x“ sind einzelne Basen bezeichnet, die nicht gelesen werden konnten. Fehlt die Sequenzinformation für mehrere Basen hintereinander, so wird dies durch eine Lücke in der Sequenz angezeigt.

Die Sequenzen sind so angeordnet, daß die vier SEC61 α -I-Gene bzw. die SEC61 α -II-Gene jeweils übereinander stehen und verglichen werden können (soweit die Sequenzen bekannt sind). Positionen, die in allen vier SEC61 α -I-Genen identisch sind, sind grün unterlegt. Positionen, die in allen vier SEC61 α -II-Genen identisch sind, sind pink unterlegt. Positionen mit identischen Basen in allen aufgeführten Sequenzen, schließlich, sind grau unterlegt.

	-100v	-90v	-80v	-70v	-60v
HS-1					GCAGCGTCGCCTC
CF-1	CCGAGGGGAAGCTCTCCCGCGCGGGCTGGGCCGCGGGCAGCGTCGCCTC				
RN-1	GTCTCGGCTGAGGAAGCGCGCTCCAGATCTAGCAGCACCGTCGCC				
MM-1					<u>CTCCTC</u>
HS-2			GGGAGCCGGTACCGAGGCCCGAGCCGCGGGAGTCTGA		
CF-2					CGAGCAGC
RN-2					
MM-2			<u>GAGCGTGTCCCCAGCCTCCGCCGCTAGGCTTTAATGTGAGGAACGGA</u>		

	-50v	-40v	-30v	-20v	-10v	1v
HS-1	ACGCGGAGCAGAGCTGAGCTGAAGCGGGACCCGGAGCCCGAGCAGCCGCC					<u>GCCATGGCA</u>
CF-1	GCTTGGGACGGAGTGGAGCAGGAGCGGGACCCGGAGTCCTAGCAGCCGCC					<u>GCCATGGCG</u>
RN-1	TCACTCGAAGTGGAGCGCAGTCGAGGCAGGGAGTGTAGTCGGACCAGCCAGCC					<u>ATGGCG</u>
MM-1	<u>ACTCGAAGTGGAGCGCAGTCGGGGCCGGGCGTGTAGTCGGATCAGCCGCC</u>					<u>ATGGCG</u>
HS-2	GCGAAGACAGCGCCGAGGCCGCGGTTTCCCCCTGGGCCTCCCCAGCAGCAGCC					<u>ATGGGC</u>
CF-2	GGGACGGGAGCGAAGGCCGCGCCGAGGCCGCCGAGCCCTCCGGGCCGCC					<u>GCCATGGGC</u>
RN-2						
MM-2	<u>GCGGAGGCAGCTGCGAGGTCGTTTTTGCCCGCCGGGTGTGCTGAGCCGTC</u>					<u>GCCATGGGC</u>

	10v	20v	30v	40v	50v	60v
HS-1	ATCAAATTTCTGGAAGTCATCAAGCCCTTCTGTGTCATCCTGCCGAAATTCAGAAACC					
CF-1	ATCAAATTTCTGGAAGTTATCAAGCCTTCTGTGTCATCCTGCCAGAGATTCAGAAACC					
RN-1	ATCAAATTTCTGGAAGTCATCAAGCCATTCTGTGTCATCCTGCCGAAATTCAGAAACC					
MM-1	<u>ATCAAATTTCTGGAAGTCATCAAGCCATTCTGTGTCATCCTGCCGAAATTCAGAAACC</u>					
HS-2	ATCAAATTTTAGAAGTTATCAAAACATTCTGTGCAGTTCTACCAGAAATTCAGAAACC					
CF-2	ATCAAATTTTAGAAGTTATCAAAACCTTCTGTGCAGTTCTACCAGAAATTCAGAAACC					
RN-2						
MM-2	<u>ATCAAGTTTTAGAAGTTATTAACCTTCTGTGCAGTTCTACCAGAAATTCAGAAACC</u>					

	70v	80v	90v	100v	110v	120v
HS-1	AGAGAGGAAGATT	CAGTTTAAG	GAGAAAGT	GCTGTGGACCGCTAT	CACCTCTTTATCT	
CF-1	GGAGAGGAAGATT	CAGTTTAAG	GAGAAAGT	GCTATGGACTGCAAT	CACCTCTTTATAT	
RN-1	AGAGAGAAAGATT	CAGTTTAAG	GAGAAAGT	GTTTGTGGACGGCCAT	CACCTCTTCATCT	
MM-1	AGAGAGAAAGATT	CAGTTTAAG	GAGAAAGT	TCTGTGGACAGCCAT	CACCTCTTCATCT	
HS-2	GGAAAGGAAAAT	CCAGTTT	AGAGAAAGT	TCTGTGGACT	GCTATAACGCTCTT	CATTT
CF-2	TGAAAGGAAAAT	CCAGTTT	AGAGAAAGT	ACTATGGACT	TGCCATAACT	CCTCTTCATTT
RN-2						
MM-2	TGAAAGGAAAAT	CAGTTT	AGAGAAAGT	ACTATGGACT	GCTATAAC	ACTCTTCATTT

	130v	140v	150v	160v	170v	180v
HS-1	TCTTAGTGTG	CTGCCAGATT	CCCCTGTTT	GGGATCATGTCT	TCAGATT	CAGCTGACCCCT
CF-1	TCTTAGTATG	CTGCCAGAT	CCCCCTGTTT	GGTATCATGTCT	TCAGATT	CAGCTGACCCCT
RN-1	TCTTAGTATG	CTGCCAGATT	CCCCTGTTT	GGCATCATGTCT	TCAGACT	CAGCTGACCCC
MM-1	TCTTAGTATG	CTGTTCAGAT	CCCCCTGTTT	GGCATCATGTCT	TCAGACT	CAGCTGACCCG
HS-2	TCTTAGTGTGTTG	T	CAGATCCC	ACTGTTT	GGAATCATGTC	ATCAGATTCTGCAGATCCT
CF-2	TCTTAGTATGTTG	T	CAGATACC	ACTATTT	GGAATCATGTC	ATCAGATTCTGCAGATCCT
RN-2						
MM-2	TCTTAGTATGCTGT	T	CAGATTCCG	CTGTTT	GGGATCATGTC	ATCGGACTCTGCAGATCCC

	190v	200v	210v	220v	230v	240v
HS-1	TTCTATTGGATGAGAGT	GATTCTAGCCT	CTTAACAGAGGC	CACATTGATGGAGCT	AGGGAT	
CF-1	TTCTACTGGATGAGAGT	GATTCTGGCCT	CTTAACAGAGGC	CACATTGATGGAGCT	TGGGTAT	
RN-1	TTCTACTGGATGCGAGT	GATTCTGGCCT	CTTAACAGAGGT	TACCTTGATGGAGCT	TGGGTAT	
MM-1	TTCTACTGGATGCGAGT	GATTCTGGCCT	CTTAACAGAGGT	TACCTTAATGGAGCT	TGGGCAT	
HS-2	TTCTACTGGATG	AGAGTTATTCT	TGGCTTCCA	ATAGAGGA	ACTTTAAT	GGAATTGGGTAT
CF-2	TTCTATTGGATG	AGAGTTATTCT	TGCATCCA	ACAGAGGA	ACTTTAAT	GGAATTGGGTAT
RN-2						
MM-2	TTCTACTGGATG	AGAGTTATTCT	TGCATCCA	ACAGAGGA	ACATTGAT	GGAATTGGGTAT

	250v	260v	270v	280v	290v	300v
HS-1	CTCTCCTATTGT	CACGTCTGGC	CTTATAATGCA	ACTCTTGGCT	TGGCGCCAAGATA	AATTG
CF-1	CTCTCCCATTGT	CACCTCTGGC	CTCATATGCAG	CTTTTGGCT	TGGTGCCAAAATA	AATTG
RN-1	CTCTCCTATTGT	CACGTCCGGC	CTTATCATGCAG	CTTTAGCT	TGGTGCCAAAGATA	AATTG
MM-1	CTCTCCTATTGT	CACCTCCGGT	CTTATCATGCAG	CTTTAGCT	TGGTGCCAAAGATA	AATTG
HS-2	CTCCCCAATTGTA	AACATCTGGTTT	GATTATGCAGTT	TGTTAGCT	TGGTGCCAAAAT	CATTG
CF-2	CTCCCCAATTGTA	AACATCTGGTTT	GATTATGCAGTT	TGTTAGCAGGAG	CCAAAAT	CATTG
RN-2				TTGTTAGCT	TGGAGCCAAAAT	CATTG
MM-2	TTCCCCAATTGTA	AACGTCTGGTTT	GATTATGCAGTT	TGTTAGCT	TGGAGCCAAAAT	CATTG

	310v	320v	330v	340v	350v	360v
HS-1	AAGTTGGTGACAC	CCCCAAAGAC	CCGAGCTCT	CTTCAACGGAG	CCCCAAAAGT	TATTTGGC
CF-1	AAGTTGGTGACAC	CCCCAAAGAC	CCGAGCCCT	CTTCAATGGAG	CCCCAAAAGT	TATTCGGC
RN-1	AAGTTGGGGACAC	CCCCGAAAGAC	CCGAGCTCT	CTTCAATGGAG	CCCCAAAAGT	TGTTTGGA
MM-1	AAGTTGGGGACAC	CCCCGAAAGAC	CCGAGCTCT	CTTCAATGGAG	CCCCAGAAAGT	TGTTTGGA
HS-2	AAGTTGGAGATAC	ACCGAAAGAT	AGAGCTTT	TATTCAAT	TGGAGCCCAG	AAACTGTTTGGT
CF-2	AAGTTGGAGATAC	ACCGAAAGAT	AGAGCTCT	TATTCAAT	TGGAGCCCAG	AAACTATTTGGT
RN-2	AAGTCGGAGATAC	ACCGAAAGAT	AGAGCTCT	TGTTCAAT	TGGAGCCCAG	AAACTATTTGGT
MM-2	AAGTTGGAGACAC	ACCGAAAGAT	AGAGCTCT	TGTTCAAT	TGGAGCCCAG	AAATTATTTGGT

	370v	380v	390v	400v	410v
HS-1	ATGATCATTACTAT	CGGCCAGT	CTATCGTGTAT	GTGATGACCGGG	ATGTATGGGGACCC
CF-1	ATGATCATTACCAT	CGGCCAGT	CCATAGTATAT	GTGATGACCGGGA	ATGTACGGGAGACC
RN-1	ATGATCATCACTAT	CGGTCACT	CCATTGTGTAC	GTGATGACCGGG	CATGTACGGGGACCC
MM-1	ATGATCATTACTAT	CGGTCACT	CCATTGTGTAT	GTGATGACCGGG	CATGTACGGGGACCC
HS-2	ATGATCATTACCAT	TGGGCAAGCC	ATTGTGTAT	GTGATGACCGGG	CATGTATGGGGACCC
CF-2	ATGATCATTACCAT	TGGGCAAGCC	ATTGTGTAT	GTGATGACCGGG	CATGTATGGGGATCC
RN-2	ATGATCATTACCAT	TGGGCAAGCC	ATTGTGTAT	GTGATGACCGGG	CATGTACGGGGACCC
MM-2	ATGATCATTACCAT	TGGGCAAGCC	ATTGTGTAT	GTGATGACCGGG	CATGTACGGGGACCC

	420v	430v	440v	450v	460v	470v
HS-1	TTCTGAAATGGGTGCTGGAATTTGCTGCTAATCACCATTTCAGCTCTTTGTTGCTGGCT					
CF-1	TTCTGAAATGGGTGCTGGAATCTGCTGTTAATCACCATCCAGCTCTTTGTTGCTGGCT					
RN-1	TTTCAGAGATGGGTGCTGGAATCTGCTGCTGATCACCATTTCAGCTCTTTGTTGCTGGCT					
MM-1	TTTCGAGATGGGTGCTGGAATCTGCTGCTGATCACCATTTCAGCTCTTTGTTGCTGGCT					
HS-2	TGCAGAAATGGGTGCCGGAATCTGTCTCCTGATCATCATTTCAGTTGTTTGTGCTGGTT					
CF-2	TGCTGAAATGGGTGCTGGCATCTGTCTCCTTATCATTATTTCAGTTGTTTGTGCTGGTT					
RN-2	TGCAGAAATGGGTGCTGGGATCTGCCTCCTTATCATTATTTCAGTTGTTTGTGCTGGTT					
MM-2	TGCGGAAATGGGTGCTGGGATCTGTCTCCTTATCATTATTTCAGTTGTTTGTGCTGGTT					

	480v	490v	500v	510v	520v	530v
HS-1	TAATTGTCCTACTTTTGGATGAACCTCTGCAAAAAGGATATGGCCTTGGCTCTGGTATT					
CF-1	TAATTGTCCTGCTTTTGGATGAACCTCTGCAAAAAGGTACGGCCTGGGCTCTGGAATC					
RN-1	TAATTGTCCTACTTTTGGATGAACCTCTGCAGAAAGGATATGGCCTTGGGCTCTGGCATC					
MM-1	TAATTGTCCTACTTTTGGATGAACCTCTGCAAAAAGGTACGGCCTTGGGCTCTGGCATT					
HS-2	TGATTGTGCTGCTGTTAGATGAGCTGCTACAGAAGGGTTACGGCTTGGGGTCTGGGATT					
CF-2	TxATTGTGCTGCTGTTAGATxxxGCTGCTACAGAAGGGTxACGGCTTGGGGTCTGGTATT					
RN-2	TGATTGTGCTGCTGTTAGATGAGCTGCTACAGAAGGGTTACGGCTTGGGGTCTGGTATT					
MM-2	TGATTGTGCTGCTGTTAGATGAGCTGCTACAGAAGGGTTACGGCTTGGGGTCTGGGATT					

	540v	550v	560v	570v	580v	590v
HS-1	TCTCTCTTCATTGCAACTAACATCTGTGAAACCATCGTATGGAAGGCATTTCAGCCCCAC					
CF-1	TCCCTCTTCATTGCCACTAACATCTGCGAGACCATTGTTTGAAGGCGTTTCAGCCCCAC					
RN-1	TCTCTCTTCATTGCGACTAATATCTGTGAGACCATTGTATGGAAGGCATTTCAGCCCCAC					
MM-1	TCTCTCTTCATTGCGACTAACATCTGTGAGACCATTGTGTGGAAGGCATTTCAGCCCCAC					
HS-2	TCCCTCTTTATTGCCACCAACATCTGTGAGACCATTGTCTGGAAGGCCTTTAGTCCCAC					
CF-2	TCCCTCTTTATTGCCACCAACATCTGTxAAAACCATTTGTCTGGAAGGCCTTxAGTCCCAC					
RN-2	TCCCTCTTTATTGCCACCAACATCTGTxAAAACCATTTGTCTGGAAGGCCTTTAGTCCCAC					
MM-2	TCCCTCTTTATTGCCACCAACATCTGTGAGACCATTGTCTGGAAGGCCTTTAGTCCCAC					

	600v	610v	620v	630v	640v	650v
HS-1	TACTGTCAACACTGGCCGAGGAATGGAATTTGAAGGTGCTATCATCGCACTTTTTCATC					
CF-1	CACCGTCAACACCGGCAGAGGAATGGAATTCGAAGGCGCCATCATTGCAGCTGTTTCATC					
RN-1	CACGTGTCAACACTGGCCGAGGATGGAATTTGAAGGCGCCATCATTGCGCTGTTTCACAC					
MM-1	CACTGTCAACACTGGCCGAGGATGGAATTCGAAGGCGCCATCATAGCGCTATTTCACAC					
HS-2	TACCATTAAACACTGGCAGAGGTACTGAGTTTGAGGGTGCAGTCATAGCTCTGTTTCATT					
CF-2	TACTATxAAACACTGGCAGAGGTACCGAGTTTGAGGGTGCAGTCATAGCGCTCTTTTCATT					
RN-2	TACCATTAAACACTGGCAGAGGTACCGAGTTTGGAAGGTGCAGTCATAGCTCTGTTTCATT					
MM-2	TACCATTAAACACTGGCAGAGGTACCGAGTTTGGAAGGTGCAGTCATAGCTCTGTTTCATT					

	660v	670v	680v	690v	700v	710v
HS-1	TGCTGGCCACACGCACAGACAAGGTCCGAGCCCTTCGGGAGGCGTTCTACCGGCAGAAT					
CF-1	TCCTGGCCACACGCACAGACAAGGTCCGAGCCCTTCGAGAGGCGTTCTACCGGCAGAAT					
RN-1	TGCTGGCCACCCGCACAGACAAGGTCCGAGCCCTTCGAGAGGCATTCTACCGGCAGAAC					
MM-1	TGCTGGCCACCCGCACAGACAAGGTCCGAGCCCTTCGAGAGGCATTCTACCGGCAGAAC					
HS-2	TGTTGGCCACCAGGACGAGACAAGGTCCGAGCTTTACGGGAGGCTTTTATTCGGCAGAAC					
CF-2	TACTGGCCACCAGGACAGACAAGGTCCGAGCTTTAAGGGAGGCGTTCTATTCGTCAGAAC					
RN-2	TGTTGGCTACCCGGACAGACAAGGTCCGAGCCCTGAGGGAGGCGTTCTATTCGGCAGAAC					
MM-2	TGCTGGCCACCAGGACAGACAAGGTGCGAGCCCTTGAGGGAGGCGTTTCTATAGGCAGAAC					

	720v	730v	740v	750v	760v	770v
HS-1	CTTCCCAACCTCATGAATCTCATCGCCACCATCTTTGTCTTTGCAGTGGTCATCTATTT					
CF-1	CTGCCCAACCTCATGAATCTGATCGCCACCATCTTTGTCTTTGCAGTGGTGATCTATTT					
RN-1	CTCCCTAACCTCATGAACCTGATTGCCACCATCTTCGTCTTTGCTGTTGTCATCTATTT					
MM-1	CTCCCAACCTCATGAACCTGATTGCCACCATCTTCGTCTTTGCCGTTGTCATCTATTT					
HS-2	TTACCCAATCTCATGAACCTCATTGCTACAGTTTTTTGTGTTTGCTGTTTATATATTT					
CF-2	TTACCCAATCTCATGAACCTCATTGCTACGGTTTTTTGTGTTTGCCGTCGTTATATATTT					
RN-2	CTCCCAACCTCATGAACCTCATCGCCACCGTCTTCGTGTTTGCCGTCGTCATCTATTT					
MM-2	CTCCCAACCTCATGAACCTCATCGCCACAGTGTTCGTCTTTGCTGTGTCATCTATTT					

	780v	790v	800v	810v	820v	830v
HS-1	CCAGGGCTTCCGAGTGGACCTGCCAATCAAGTCGGCCCGCTACCGTGGCCAGTACAACA					
CF-1	TCAGGGCTTCCGTGTGGACCTGCCCATCAAGTCAGCCCGTTACCGAGGCCAGTACAACA					
RN-1	CCAGGGCTTCCGAGTGGACCTTCCAATCAAGTCGGCGCGTTACCGAGGCCAGTACAATA					
MM-1	CCAGGGCTTCCGAGTGGACCTTCCAATCAAGTCGGCGCGTTACCGAGGCCAGTACAACA					
HS-2	CCAAGGATTTCGCGTTGATCTGCCATTAAAGTCGGCCCGTTACCGAGGACAGTACAGCA					
CF-2	TCAGGGATTTCGTGTTGACTTGCCCATCAAGTCGGCCCGGTATCGAGGACAGTACAGTA					
RN-2	TCAGGGGTTTCGTGTTGACTTGCCCATTAAGTCGGCCCGGTATCGCGGACAGTACAGTA					
MM-2	TCAGGGGTTTCGTGTTGACTTGCCCATTAAGTCGGCACGGTATCGTGGACAGTACAGTA					

	840v	850v	860v	870v	880v	890v
HS-1	CCTATCCCATCAAGCTCTTCTATACGTCCAACATCCCCATCATCCTGCAGTCTGCCCTG					
CF-1	CCTACCCTATCAAGCTCTTCTACACTTCCAACATCCCCATCATCCTGCAGTCCGCCCTG					
RN-1	CCTACCCCATCAAGCTCTTCTACACCTCCAACATTCCCATCATCTTGAGTCTGCTCTG					
MM-1	CCTATCCCATCAAGCTCTTCTACACCTCCAACATCCCCATCATCTTGAGTCTGCTCTG					
HS-2	GCTACCCCATCAAACCTCTTCTACACCTCCAACATCCCCATCATCTTCAGTCCGCCCTG					
CF-2	GCTATCCCATCAAGCTCTTCTATACCTCGAACATTCCCATTATTCTCCAGTCCGCCCTTA					
RN-2	GCTATCCCATCAAGCTCTTCTACACATCGAATATTCCCATAATCTTCAGTCCGCCCTTA					
MM-2	GCTATCCTATCAAGCTCTTCTACACGTGCAATATTCCCATAATCTTCAGTCTGCCCTTA					

	900v	910v	920v	930v	940v	950v
HS-1	GTGTCCAACCTTTATGTGATCTCCCAATGCTCTCAGCTCGCTTCAGTGGCAACTTGCT					
CF-1	GTGTCCAACCTGTACGTGATCTCCAGATGCTGTCCGCCCGCTTCAGTGGCAACCTGCT					
RN-1	GTGTCCAACCTGTATGTGATCTCCAGATGCTGTCCAGCACGTTTCAGTGGCAACCTGCT					
MM-1	GTGTCCAACCTGTATGTGATCTCCAGATGCTGTCCAGCACGCTTCAGTGGCAACCTGCT					
HS-2	GTGTCCAACCTGTATGTTATTTCCAGATGCTGTCTGTTTCGATTTAGTGGCAACTTTT					
CF-2	GTGTCAAACCTGTATGTTATTTCCAGATGCTGTCTGTTTCGATTTAGTGGCAACTTTT					
RN-2	GTTTCAAACCTGTACGTGATTTCCAGATGCTGTCTGTTTCGATTTAGTGGCAACTTCTT					
MM-2	GTTTCAAACCTGTACGTGATTTCCAGATGCTGTCTGTTTCGATTTAGTGGCAACTTCTT					

	960v	970v	980v	990v	1000v
HS-1	GGTCAGCCTGCTGGGCACCTGGTTCGGACACGCTCTCTGGGGGCCAGCACGTGCTTATC				
CF-1	GGTCAGCCTGCTGGGTACCTGGTTCGATACTTCTTCGGGGGCCAGCACGGGCGTACC				
RN-1	GGTTAGCCTGCTGGGCACCTGGTTCGGATACGTCATCTGGGGGCCAGCCCCGCTTACC				
MM-1	GGTTAGCCTGCTGGGCACCTGGTTCGGATACATCATCTGGGGGCCAGCCCCGAGCTTACC				
HS-2	AGTAAATTTACTAGGACAGTGGGCCGATGTGAGTGGGGGAGGACCCGCACGTTCTTACC				
CF-2	AGTAAATTTACTAGGACAGTGGGCTGATGTTAGTGGGGGAGGACCTGCTCGTTCTTACC				
RN-2	AGTAAACTTTACTAGGACAGTGGGCCGATGTGAGCGGGGGAGGACCTGCTCGCTCCTACC				
MM-2	AGTAAACTTTACTAGGACAGTGGGCCGATGTGAGTGGGGGAGGgCCTGCTCGCTCCTACC				

	1010v	1020v	1030v	1040v	1050v	1060v
HS-1	CAGTTGGTGGCCTTTGCTATTACCTGTCCCCTCCAGAATCTTTTGGCTCCGTGTTAGAA					
CF-1	CAGTGGGTGGCCTTTGCCACTACCTATCCCCTCCAGAATCTTTTGGCTCCGTGTTAGAA					
RN-1	CAGTTGGTGGCCTGTGTTACTACCTGTCTCCTCCGGAATCATTCGGCTCAGTGCTGGAG					
MM-1	CCGTTGGTGGCCTGTGTTACTACCTGTCTCCTCCGGAATCGTTTCGGCTCAGTGCTGGAG					
HS-2	CAGTTGGAGGCCTTTGTTACTATCTTTCTCCTCCTGAGTCCATGGGCGCCATCTTTGAG					
CF-2	CTGTGGGAGGCCTTTGTTACTATCTTTCTCCTCCTGAGTCCATGGGCGCCATATTTGAG					
RN-2	CTGTTGGTGGCCTGTGTTACTATCTCTCTCCTCCTGAGTCCATGGGAGCCATATTTGAG					
MM-2	CTGTTGGCGGCCTTTGTTACTATCTGTCTCCTCCTGAGTCTATGGGAGCCATATTTGAG					

	1070v	1080v	1090v	1100v	1110v	1120v
HS-1	GACCCGGTCCATGCAGTTGTATACATAGTGTTCATGCTGGGCTCCTGTGCAATTCTTCTC					
CF-1	GACCCTGTCCATGCTGTGGTGTACATAGTGTTCATGCTCGGCTCGTGTGCGTTCTTCTC					
RN-1	GACCCTGTCCATGCGGTGCTGTACATTGTATTTCATGCTGGGTTCTGTGCAATTCTTTTC					
MM-1	GACCCTGTCCATGCGGTGCTGTACATCTGTTCATGCTGGGCTCCTGTGCAATTCTTCTC					
HS-2	GATCCTGTCCATGTCGTTGTTTATATCATCTTCATGTTGGGGTCATGTGCAATTCTTCTC					
CF-2	GATCCTGTTCATGTAGTCGTGTATATTATCTTCATGTTGGGGTCGTGTGCAATTCTTTTC					
RN-2	GATCCTGTTCATGTAGTCGTGTATATTATCTTCATGTTGGGGTCGTGTGCAATTCTTTTC					
MM-2	GATCCTGTTCATGTAGTTGTATATATTATCTTCATGTTGGGGTCATGTGCAATTCTTTTC					

	1130v	1140v	1150v	1160v	1170v	1180v
HS-1	CAAAACGTGGATTGAGGTCTCAGGTTCTCTG	CCAAAGATGTTGCAAAGCAGCTGAAGG				
CF-1	CAAAACCTGGATTGAGGTCTCGGGCTCTCTG	CCAAAGATGTTGCAAAGCAGCTGAAGG				
RN-1	CAAAACATGGATCGAAGTTTCGGGTTCTTCTG	CCAAAGATGTTGCAAAGCAGCTGAAGG				
MM-1	CAAAACATGGATCGAAGTCTCAGGTTCTTCTG	CCAAAGATGTTGCAAAGCAGCTGAAGG				
HS-2	TAAGACATGGATTGAAGTGTCTGGTTCTCTCAG	CCAAAGATGTAGCTAAACAGCTGAAAG				
CF-2	TAAGACATGGATAGAGGTGTCTGGTTCTCTGCT	AAAGATGTAGCTAAGCAGCTTAAAG				
RN-2	TAAGACGTGGATAGAAGTTTCTGGTTCTCTCAG	CCAAAGATGTGGCCAAGCAGCTTAAAG				
MM-2	TAAGACGTGGATAGAAGTTTCTGGTTCTTTCAG	CCAAAGATGTGGCCAAGCAACTTAAAG				

	1190v	1200v	1210v	1220v	1230v	1240v
HS-1	AGCAGCAGATGGTGATGAGAGGCCACCGAGAG	ACCTCCATGGTCCATGAACCTCAACCGG				
CF-1	AACAGCAGATGGTGATGAGGGGCCATCGAGAG	ACTTCCATGGTGCATGAACCTCAATCGG				
RN-1	AGCAGCAGATGGTGATGAGAGGCCACAGGGAG	ACCTCCATGGTGCATGAGCTCAACCGG				
MM-1	AGCAGCAGATGGTGATGAGGGGCCACAGGGAG	ACCTCCATGGTGCATGAGCTCAACCGG				
HS-2	AACAGCAGATGGTAATGAGGGGGCCACCGAG	ATACCTCTATGGTTCATGAGCTTAATAGG				
CF-2	AACAGCAAATGGTAATGAGGGGGCCACAGAG	ATACCTCCATGGTTCATGAGCTTAATAGG				
RN-2	AGCAGCAGATGGTGATGAGGGGGCCACAGAG	ACACCTCCATGGTTCATGAGCTGAACAGG				
MM-2	AACAGCAGATGGTGATGAGGGGTCACAGAG	ATACCTCCATGGTTCATGAGCTGAACAGG				

	1250v	1260v	1270v	1280v	1290v	1300v
HS-1	TACATCCCCACAGCCGCGGCCCTTTGGTGGG	CTGTGCATCGGGGCCCTCTCGGTCCTGGC				
CF-1	TACATCCCCACAGCTGCAGCCTTTCGGTGGG	CTGTGCATCGGGGCCCTCTCCGTCCTGGC				
RN-1	TACATCCCCACAGCTGCAGCCTTTCGGTGGG	CTGTGCATTGGGGGCCCTCTCTGTCTGGC				
MM-1	TACATCCCCACAGCCGCGAGCCTTTGGTGGG	CTGTGCATTGGGGGCCCTCTCTGTCTGGC				
HS-2	TACATCCCCACCGCAGCTGCGTxxxGCGGT	TTGTGCATTGGCGCCCTGTCTAGTGTGGC				
CF-2						
RN-2	TACATCCCCACAGCAGCTGCCTTTGGGGGT	CTATGCATCGGTGCCCTGTCTGGTACTAGC				
MM-2	TACATCCCCACAGCAGCTGCCTTTGGGGGT	CTGTGCATCGGTGCCCTGTCTAGTACTAGC				

	1310v	1320v	1330v	1340v	1350v	1360v
HS-1	TGACTTCCTAGGCGCCATTGGGCTCTGGAAC	CGGGATCCTGCTCGCAGTCACAATCATCT				
CF-1	CGACTTCCTGGGCGCCATTGGGCTCTGGAAC	CGGGATCCTGCTGGCAGTCACAATCATCT				
RN-1	TGATTTCTGGGTGCTATCGGGCTCTGGCAC	CGGGATCCTGCTGGCGGTACCATCATCT				
MM-1	TGACTTCCTGGGTGCTATCGGGCTCTGGAAC	TGGGATCCTGCTTGCGGTACCATCATCT				
HS-2	TGACTTCCTGGGGGCCATTGGATCTGGCACT	TGGAATTCTGCTAGCAGTCACTATTATTT				
CF-2						
RN-2	AGACTTCCTGGGCGCCATTGGCTCGGGCACT	TGGAATTCTGCTTGCACTACTATTATTT				
MM-2	AGACTTCCTTGGGGCCATTGGCTCTGGTACT	TGGAATTCTGCTTGCACTACTATTATTT				

	1370v	1380v	1390v	1400v	1410v	1420v
HS-1	ACCAGTACTTTGAGATCTTCGTTAAGGAG	CAAAGCGAGGTTGGCAGCATGGGGGCCCTTG				
CF-1	ACCAGTACTTTGAAATCTTCGTAAGGAG	CAGAGCGAGGTCGGCAGCATGGGCGCCCTT				
RN-1	ACCAGTACTTTGAGATCTTCGTCAAAGAG	CAGAGCGAGGTTGGGCAGCATGGGAGCCCTT				
MM-1	ACCAGTACTTTGAGATCTTCGTCAAGGA	ACAGAGCGAGGTTGGGCAGCATGGGAGCCCTT				
HS-2	ACCAGTATTTTGAATATTTTGTTAAAGA	ACAGGCCGAAGTTGGTGGGATGGGTGCTTTG				
CF-2						
RN-2	ATCAGTATTTTGAATATTTTGTTAAGGA	ACAGGCTGAAGTTGGTGGAAATGGGTGCTTTG				
MM-2	ATCAGTATTTTGAATATTTTGTTAAGGA	ACAGGCTGAAGTTGGTGGAAATGGGTGCTTTG				

	1430v	1440v	1450v	1460v	1470v	1480v
HS-1	CTCTTCTGAGCCCGTCTCCCGGACAGGTT	GAGGAAGCTGCTCCAGAAGCGCCTCGGAAG				
CF-1	CTGTTCTGAGCCAAGTCTCCCTGGACCA	AAGGAGAGGGGCCCTGCATGGAATTGCAAGGG				
RN-1	CTCTTCTGAGCCTCGTGTGCCTGTGGAC	CAGGGTGAGGGCACAGGCTCCAGAAGTCCCC				
MM-1	CTCTTCTGAGCCTTGCGTGCCCGTGGAC	CAGGGTGAGGGCACAGGCTCCAGAAGTCCCC				
HS-2	TTTTTCTAAATGTTCAAATATTTTCATTT	TGTGCGTGT				
CF-2						
RN-2	TTTTTCTAAATGTTTCATCTATTTTGTGT	GTTGTGAAAGGGAAATATTTTGGCATACTGTTT				
MM-2	TTTTTCTAAATGTTTCATCTATTTCTTTGT	GTTGTGAAAGGGAAATATTTTGGCATACTGTTT				

	1490v	1500v	1510v	1520v	1530v	1540v
HS-1	GGGAGCTCTCATCATGGCGCGTGTCTGCTGCGGCATATGGACTTTTAATAATGTTTTTGA					
CF-1	AGGGGAACAACGACACCTCACTGTGGGGTGCTCATCGCAGGAGTGCTGCCGTGGCACCG					
RN-1	CGGAAGGTGCTCTTACTGCTGGAGCATGCTACTGTGGCATAGGGACTTTAATTTTTTTT					
MM-1	AGGAAGGTGCTCTTACTGCTGGAGCATGCTACTGTGGCATAGGGACTTTAATTTTTTTT					
HS-2						
CF-2						
RN-2	CTGTCAAATGATGCTGGTTCCCCTTTCTTCCCACAGTTTGTTGTTTTTCAGTGCTAAGCA					
MM-2	TGTTTCTGTCAAATAATGCTGGTTCCCCTTTCTTCCCCTCAGTTTGTTGTTTTTCAGTGCT					

	1550v	1560v	1570v	1580v	1590v
HS-1	ATTTTCGTATTCTTTTCATTCCACTGTGTAAAGTGCTAGACATTTTCCATTTAAAAATTTTG				
CF-1	GGACTTTTAAATAATGTTTTTGAATTTTCATATTCTTTTCATTCCACTTTGTAAAGTGCTAG				
RN-1	TTTTTAATTTTCATATCTCTTCATTCAACTGTGTAAAGTGCTAGGAAATTTGCAATTTGA				
MM-1	TTTTAATTTTTTTTTTAAATTTTCATATCTTTTCATTCCACTGTGTAAAGTGCTAGGAAAT				
HS-2					
CF-2					
RN-2	CCCCGTTTCTGGAGTGGGAGGAGCTAAGCCTGTGCGCAGCATCAGTACCAGCTGCCTTA				
MM-2	CACTGTCCCATTTCTGAAGTGGGCACAGAGCTAAGCCTGTGTGCAGCATCAGTACCAGC				

	v	1610v	1620v	1630v	1640v	1650v
HS-1	CTTTTTATCCTGGC					
CF-1	AATTTTTCAAGTTTGAAATTTTGCTTTTTATTCTGGCATTGGCAAAAAAGAACAGTAGA					
RN-1	AGTTTTGCTTTTTCTGACATTGGCAAGAGACTGATAGAATT					
MM-1	TTCCAATTTTAAATTTT					
HS-2						
CF-2						
RN-2	AAACTCAAGTTTACATTCTTTGTGCGAGCACTGTCCATCTAGTGTTAGCCATGAGCGACT					
MM-2	TGCCTTAAACTGAAGTTTACATTATTTGTTGACACTGTCCATCTAGTGTTAGCCATGA					

	v	1670v	1680v	1690v	1700v	1710v
HS-1						
CF-1	AGAGAGATTTTCTTGAGCTGACTGCCAGAGGTGGGGATGGTAAATGTCCCCAAGTGTC					
RN-1						
MM-1						
HS-2						
CF-2						
RN-2	GGGAAXXXXTGGACCTGCCTGGCTGTTGGTCAGACAGCAGACTGGGCATGGGTACAGC					
MM-2	CGCTGGGAAGCAGTgTATCTGCCTCGCTGTTGGTCA					

	1720v	1730v	1740v	1750v	1760v	1780v
HS-1						
CF-1	CTGTAACTTTTGTTTTTAACCTTTGCACCTGCTCAGTGCCGGACGGCTGCAGTGGTCTGA					
RN-1						
MM-1						
HS-2						
CF-2						
RN-2	TTTGGCACACGACATTGAGAACACGGAGTACCCCTTGTTTTAAAGATAAATGCAGTGCAG					
MM-2						

	1790v	1800v	1810v	1820v	1830v	1840v
HS-1						
CF-1	GCTGTTCCCCCACCAGGGATGTCTTTTTTGGTTAAAAAGCACAAACCTCGTGGCAGTGT					
RN-1						
MM-1						
HS-2						
CF-2						
RN-2	ATTGCCACTTTCCAGTGTTTTGAGCTTCCCCAAT					
MM-2						

7. Literaturverzeichnis

Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H. und Mizushima, S. (1991). Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 6545-6549.

Akiyama, Y. und Ito, K. (1987). Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. EMBO J 6, 3465-3470.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Eds.) (1992). Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates, New York.

Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. und Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. Science 278, 2123-2126.

Biederer, T., Volkwein, C. und Sommer, T. (1996). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 15, 2069-2076.

Brodsky, J.L., Goeckeler, J. und Schekman, R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 9643-9646.

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162, 156-159.

Craig, J.M. und Bickmore, W.A. (1993). Chromosome bands--flavours to savour. Bioessays 15, 349-354.

Crowley, K.S., Reinhart, G.D. und Johnson, A.E. (1993). The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. Cell 73, 1101-1115.

Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D. und Johnson, A.E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. Cell 78, 461-471.

Daimon, M., Susa, S., Suzuki, K., Kato, T., Yamatani, K. und Sasaki, H. (1997). Identification of a human cDNA homologue to the Drosophila translocation protein 1 (Dtrp1). Biochem Biophys Res Commun 230, 100-104.

Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. 105, 633-645.

- Deshaies, R.J. und Schekman, R. (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109, 2653-2664.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A. und Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349, 806-808.
- Do, H., Falcone, D., Lin, J., Andrews, D.W. und Johnson, A.E. (1996). The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* 85, 369-378.
- Emr, S.D., Vassarotti, A., Garrett, J., Geller, B.L., Takeda, M. und Douglas, M.G. (1986). The amino terminus of the yeast F1-ATPase beta-subunit precursor functions as a mitochondrial import signal. *J. Cell Biol.* 102, 523-533.
- Esnault, Y., Blondel, M.O., Deshaies, R.J., Schekman, R. und Képès, F. (1993). The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 12, 4083-4093.
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M.O., Schekman, R. und Képès, F. (1994). SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J. Biol. Chem.* 269, 27478-27485.
- Fang, H. und Green, N. (1994). Nonlethal sec71-1 and sec72-1 mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 5, 933-942.
- Feldheim, D., Yoshimura, K., Admon, A. und Schekman, R. (1993). Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 4, 931-939.
- Feldheim, D. und Schekman, R. (1994). Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J. Cell Biol.* 126, 935-943.
- Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., Andre, B., Baclet, M.C., Barthe, C., Baur, A., Becam, A.M., Biteau, N., Boles, E., et al (1994). Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBO J.* 13, 5795-5809.
- Fitch, W.M. (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst Zool* 19, 99-113.
- Glover, J.R., Andrews, D.W. und Rachubinski, R.A. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10541-10545.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S. und Rapoport, T.A. (1992a). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357, 47-52.

Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.U. und Rapoport, T.A. (1992b). A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71, 489-503.

Görlich, D. und Rapoport, T.A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-630.

Green, N., Fang, H. und Walter, P. (1992). Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 116, 597-604.

Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E. und Johnson, A.E. (1997). The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89, 535-544.

Hamman, B.D., Hendershot, L.M. und Johnson, A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. und Akey, C.W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87, 721-732.

Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T.A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367, 654-657.

High, S., Görlich, D., Wiedmann, M., Rapoport, T.A. und Dobberstein, B. (1991). The identification of proteins in the proximity of signal-anchor sequences during their targeting to and insertion into the membrane of the ER. *J. Cell Biol.* 113, 35-44.

High, S., Andersen, S.S., Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A. und Dobberstein, B. (1993a). Sec61p is adjacent to nascent type I and type II signal-anchor proteins during their membrane insertion. *J. Cell Biol.* 121, 743-750.

High, S., Martoglio, B., Görlich, D., Andersen, S.S., Ashford, A.J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B., et al (1993b). Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J. Biol. Chem.* 268, 26745-26751.

Jungnickel, B. und Rapoport, T.A. (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 82, 261-270.

Kalies, K.U., Görlich, D. und Rapoport, T.A. (1994). Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J. Cell Biol.* 126, 925-934.

- Kalies, K.U., Rapoport, T.A. und Hartmann, E. (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol* 141, 887-894.
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J. und Gilmore, R. (1997). The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J Biol Chem* 272, 32513-32520.
- Kellaris, K.V., Bowen, S. und Gilmore, R. (1991). ER translocation intermediates are adjacent to a nonglycosylated 34-kD integral membrane protein. *J. Cell Biol.* 114, 21-33.
- Knight, B.C. und High, S. (1998). Membrane integration of Sec61alpha: a core component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *Biochem J* 331, 161-167.
- Kurihara, T. und Silver, P. (1993). Suppression of a sec63 mutation identifies a novel component of the yeast endoplasmic reticulum translocation apparatus. *Mol. Biol. Cell* 4, 919-930.
- Kutay, U., Hartmann, E. und Rapoport, T.A. (1993). A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol.* 3, 72-75.
- Kutay, U., Ahnert Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B. und Rapoport, T.A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 14, 217-223.
- Laird, V. und High, S. (1997). Discrete cross-linking products identified during membrane protein biosynthesis. *J Biol Chem* 272, 1983-1989.
- Larsen, N., Samuelsson, T. und Zwieb, C. (1998). The Signal Recognition Particle Database (SRPDB). *Nucleic Acids Res* 26, 177-178.
- Liao, S., Lin, J., Do, H. und Johnson, A.E. (1997). Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* 90, 31-41.
- Lundin, L.G. (1993). Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. *Genomics* 16, 1-19.
- Lyman, S.K. und Schekman, R. (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131, 1163-1171.
- Lyman, S.K. und Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88, 85-96.
- Macfarlane, J. und Müller, M. (1995). The functional integration of a polytopic membrane protein of *Escherichia coli* is dependent on the bacterial signal-recognition particle. *Eur J Biochem* 233, 766-771.

MacGrogan, D., Levy, A., Bova, G.S., Isaacs, W.B. und Bookstein, R. (1996). Structure and methylation-associated silencing of a gene within a homozygously deleted region of human chromosome band 8p22. *Genomics* 35, 55-65.

Martoglio, B., Hofmann, M.W., Brunner, J. und Dobberstein, B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81, 207-214.

Meyer, H.A. und Hartmann, E. (1997). The yeast SPC22/23 homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J Biol Chem* 272, 13159-13164.

Mothes, W., Prehn, S. und Rapoport, T.A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.* 13, 3973-3982.

Mothes, W., Heinrich, S.U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J. und Rapoport, T.A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, 523-533.

Mothes, W., Jungnickel, B., Brunner, J. und Rapoport, T.A. (1998). Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 142, 355-364.

Neuhof, A., Rolls, M.M., Jungnickel, B., Kalies, K.U. und Rapoport, T.A. (1998). Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol Biol Cell* 9, 103-115.

Ng, D.T., Brown, J.D. und Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, 269-278.

Ng, D.T. und Walter, P. (1996). ER membrane protein complex required for nuclear fusion. *J. Cell Biol.* 132, 499-509.

Nicchitta, C.V., Murphy, E.C.3., Haynes, R. und Shelness, G.S. (1995). Stage- and ribosome-specific alterations in nascent chain-Sec61p interactions accompany translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* 129, 957-970.

Nilsson, I., Whitley, P. und von Heijne, G. (1994). The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase. *J. Cell Biol.* 126, 1127-1132.

Nishiyama, K., Mizushima, S. und Tokuda, H. (1993). A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12, 3409-3415.

Nishiyama, K., Hanada, M. und Tokuda, H. (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecE) reveals the direct involvement and important function of SecE in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* 13, 3272-3277.

- Noel, P. und Cartwright, I.L. (1994). A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *EMBO J* 13, 5253-5261.
- Ogg, S.C., Poritz, M.A. und Walter, P. (1992). Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 3, 895-911.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T.A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81, 561-570.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J. und Rapoport, T.A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94, 795-807.
- Pohlschröder, M., Prinz, W.A., Hartmann, E. und Beckwith, J. (1997). Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* 91, 563-566.
- Powers, T. und Walter, P. (1995). Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. *Science* 269, 1422-1424.
- Powers, T. und Walter, P. (1997). Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor. *EMBO J* 16, 4880-4886.
- Raden, D. und Gilmore, R. (1998). Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex. *Mol Biol Cell* 9, 117-130.
- Rapiejko, P.J. und Gilmore, R. (1997). Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, 703-713.
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B. und Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65, 271-303.
- Rose, M.D., Misra, L.M. und Vogel, J.P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* 57, 1211-1221.
- Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G. und Schekman, R. (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* 109, 2641-2652.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J. und Silver, P. (1989). A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *J. Cell Biol.* 109, 2665-2675.
- Schatz, G. und Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.

Scidmore, M.A., Okamura, H.H. und Rose, M.D. (1993). Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 4, 1145-1159.

Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Silberstein, S. und Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* 10, 849-858.

Simon, S.M. und Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65, 371-380.

Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H.-M., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K. et al. (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179, 7135-7155.

Sommer, T. und Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176-179.

Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. und Schekman, R. (1992). Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 3, 129-142.

Stotz, A. und Linder, P. (1990). The ADE2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: sequence and new vectors. *Gene* 95, 91-98.

TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D. und Novick, P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 6483-6494.

Toikkanen, J., Gatti, E., Takei, K., Saloheimo, M., Olkkonen, V.M., Söderlund, H., De Camilli, P. und Keranen, S. (1996). Yeast protein translocation complex: isolation of two genes SEB1 and SEB2 encoding proteins homologous to the Sec61 beta subunit. *Yeast* 12, 425-438.

Ulbrandt, N.D., Newitt, J.A. und Bernstein, H.D. (1997). The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell* 88, 187-196.

Valent, Q.A., Scotti, P.A., High, S., de Gier, J.W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B. und Lührink, J. (1998). The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J* 17, 2504-2512.

Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E. und Rapoport, T.A. (1996). Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, 25-35.

von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184, 99-105.

- Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. und Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* 6, 3543-3557.
- Walter, P. und Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 87-119.
- Walton, P.A., Hill, P.E. und Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* 6, 675-683.
- Wiedmann, M., Kurzchalia, T.V., Bielka, H. und Rapoport, T.A. (1987). Direct probing of the interaction between the signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific cross-linking. *J. Cell Biol.* 104, 201-208.
- Wilkinson, B.M., Critchley, A.J. und Stirling, C.J. (1996). Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J Biol Chem* 271, 25590-25597.
- Wilkinson, B.M., Esnault, Y., Craven, R.A., Skiba, F., Fieschi, J., Képès, F. und Stirling, C.J. (1997). Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *EMBO J* 16, 4549-4559.
- Wolfe, K.H. und Shields, D.C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-713.
- Zambrowicz, B.P., Friedrich, G.A., Buxton, E.C., Lilleberg, S.L., Person, C. und Sands, A.T. (1998). Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cell. *Nature* 392, 608-611.

Lebenslauf

Kerstin Finke	geb. 1965	in Bremen
	1986 – 1992	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
	05.1991 – 04.1992	Anfertigung der Diplomarbeit am Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH) an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg unter Anleitung von Dr. M. Eilers und Prof. Dr. H. Bujard. Thema: „Untersuchungen zur Funktion von Alpha-Prothymosin“
	09.1992 – 12.1995	Experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Biochemie des Klinikums der Humboldt-Universität zu Berlin (Charité) und am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch unter Anleitung von Prof. S. Prehn (Charité), Dr. E. Hartmann (MDC), Dr. T. Sommer (MDC) und Prof. T.A. Rapoport (MDC)

Publikationsliste

Jansen-Dürr, P., Meichle, A., Steiner, P., Pagano, M., Finke, K., Botz, J., Wessbecher, J., Draetta, G., und Eilers, M. (1993). Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3685-3689.

Philipp, A., Schneider, A., Väsrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., und Eilers, M. (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol Cell Biol* 14, 4032-4043.

Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., und Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 15, 1482-1494.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Kerstin Finke, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Darüber hinaus habe ich mich weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben noch bin ich im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Ober-Ramstadt, den 04.01.99

Kerstin Finke

Danksagung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde teilweise an der Charité im Institut für Biochemie der Humboldt-Universität zu Berlin, teilweise am Max-Delbrück-Centrum (MDC) für molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt. Die Untersuchungen der paralogen SEC61-Gene in Säugerzellen im Institut für Biochemie von September 1992 bis Oktober 1993 erfolgten unter Anleitung von Prof. Siegfried Prehn, die Arbeiten zum Ssh1p-Komplex in der Hefe *S. cerevisiae* von November 1993 bis Dezember 1995 wurden am MDC durch Dr. Enno Hartmann, Dr. Thomas Sommer und Prof. Tom Rapoport betreut.

Ich möchte allen, die mir bei der Erstellung dieser Promotion mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, herzlich danken. Außer an die direkten Betreuer der Arbeit geht mein Dank auch an alle Mitglieder der Arbeitsgruppen Prehn, Hartmann, Sommer und Rapoport. Besonders bedanken möchte ich mich bei Kathrin Plath, die während meiner Schwangerschaft die Experimente mit radioaktiven Materialien an meiner Stelle durchgeführt hat. Jacqueline Franke, Marylena Dabrowsky, Steffen Panzner, Thomas Sommer und insbesondere Enno Hartmann danke ich für das Lesen der Promotionsschrift und die Korrekturvorschläge.

Ohne die ausdauernde und tatkräftige Unterstützung meiner Familie wäre die Fertigstellung der Arbeit in dieser Form mit Sicherheit nicht möglich gewesen: allen vier Großeltern unserer Kinder, besonders aber den beiden Großmüttern sei vielmals gedankt für die liebevolle Betreuung ihrer beiden Enkeltöchter, die mir immer wieder die notwendigen „Freizeiten“ zum Schreiben der Arbeit schuf. Meinem Mann Lothar, schließlich, kann ich nicht genug danken, für seine Geduld, seine Umsicht und seine Liebe.